Rachel Rocha Cintra	**Funções Sensoriais em um Modelo Progressivo de Parkinsonismo**	**2015**

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

RACHEL ROCHA CINTRA

FUNÇÕES SENSORIAIS EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO

SÃO CRISTÓVÃO - SE
2015

RACHEL ROCHA CINTRA

FUNÇÕES SENSORIAIS EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO

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

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

Co-orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO - SE
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Cintra, Rachel Rocha
C575f Funções sensoriais em um modelo progressivo de parkinsonismo / Rachel Rocha Cintra ; José Ronaldo dos Santos. – São Cristovão, 2015.
92 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Parkinson, doença de. 2. Percepção auditiva. 3. Reserpina 4. Medição da dor. I. Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 616.858

RACHEL ROCHA CINTRA

FUNÇÕES SENSORIAIS EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO

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

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

1º Examinador: Prof. Dr. Luís Felipe Souza da Silva (UFS)

2º Examinador: Profª. Drª. Alessandra Mussi Ribeiro (UNIFESP)

Dedico este trabalho à minha pequena Clarice e a todos aqueles que acreditam que sempre há tempo para realizar um sonho.

Esse trabalho foi desenvolvido com o auxílio da CAPES, através da concessão de uma bolsa de mestrado, do CNPq e FAPITEC/SE através de recursos financeiros aprovados em editais específicos e do PROCFIS através do suporte financeiro e logístico dado ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, ao qual estou vinculada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Murilo Marchioro, por acreditar em mim, por me mostrar o caminho da ciência, por me dar a oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo exemplo de profissional e de pessoa, pela calma, pela paciência e pela disponibilidade constante.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pelo apoio exemplar na condução desse trabalho.

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

Ao amigo, Dr. Giordano Viola, pelo enorme apoio em pontos importantes desta pesquisa.

Aos meus amigos do laboratório de Neurofisiologia (nosso segundo lar!), pela união, pelo imenso apoio, pela raça, pela amizade e pelos momentos divertidos que tornaram mais leve esta caminhada!

Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pelo apoio teórico e logístico e pela amizade.

Aos amigos que a fisiologia me deu! Lívia Lins (minha irmã!), Katty Anne Amador e Marina Freire: nosso quarteto vai ficar na história! Sinto-me abençoada por ter encontrado vocês no meu caminho! Marcos Meneses, Auderlam Mendonça, Pollyana Caldeira Leal, Luciano Gois, Edênia Cunha, Patrícia Rabelo, Ana Carla Araújo, Renan Guedes, Larissa Resende, Matheus Macedo Lima, Fabíola Abreu, Diogo Prudente, posso dizer que tenho grandes amigos em Sergipe! Nunca me esquecerei de vocês!

À amiga Prfª. Drª. Rosana Givigi, por quem eu tenho enorme gratidão, pelo direcionamento, aconselhamento e apoio.

Ao meu marido, Alessandro Brum, cujo apoio incondicional me possibilitou concretizar este sonho! Eu não estaria aqui se não fosse você!!!

À minha menina, Clarice, meu sonho, minha inspiração, minha motivação!

Ao meu pai, Joaquim Cintra Junior, exemplo de vida! Grande incentivador, cuja colaboração foi de extrema importância para a realização desse trabalho.

À minha mãe pelo exemplo de garra e perseverança no qual me espelho todos os dias!

À Deus e à vida que me guiaram nesta direção!

RESUMO

FUNÇÕES SENSORIAIS EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO, Rachel Rocha Cintra, São Cristóvão, 2015.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa comum do movimento, que afeta 1% da população acima de 65 anos e 4% a 5% da população acima de 75 anos. Atualmente, sabe-se que a doença não é caracterizada somente pelas alterações motoras, mas também por um conjunto de alterações não motoras, que talvez as precedam por vários anos, em fase pré-clínica da doença. Estudos na fase pré-motora da DP são importantes para o entendimento sobre quando e onde a doença começa a se desenvolver e como ela evolui nos estágios iniciais. Apesar de ainda incipientes, alguns estudos têm apontado para a presença de alterações sensoriais, nociceptivas e auditivas, na DP. O uso de um modelo animal da DP, que leve em conta a sua natureza progressiva, possibilita uma melhor compreensão das relações entre os aspectos fisiopatológicos e as alterações não motoras da doença e viabiliza a exploração temporal da manifestação dessas alterações. O objetivo desse estudo foi avaliar as funções nociceptiva, motora e auditiva de ratos Wistar submetidos ao modelo progressivo de parkinsonismo, induzido por doses baixas e repetidas de reserpina (RES). Na primeira etapa, foram utilizados 19 ratos Wistar, divididos em dois grupos (n=9/10 por grupo): G1: RES (0,1 mg/kg s.c.) e G2: CTR (veículo da RES). Os animais foram submetidos diariamente ao teste motor de catalepsia e ao teste nociceptivo do von Frey eletrônico, e receberam as injeções a cada 48h, durante 20 dias. O teste de força de preensão (*grip strenght test*) foi realizado nos dias 9, 12, 14 e 17. Na segunda etapa, os animais foram divididos em dois grupos (n=10/11 por grupo): G1: RES (0,1 mg/kg s.c.) e G2: CTR (veículo da RES). O teste de catalepsia foi realizado diariamente e as injeções foram feitas a cada 48h. No dia 8, os animais foram sedados para realização do teste auditivo de otoemissões acústicas por produto de distorção (OEAPD). No dia 10, foi realizado o teste nociceptivo da formalina e, 60 minutos depois, cada animal foi anestesiado, perfundido e seus cérebros extraídos para posterior análise imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e c-FOS. O tratamento repetido com a RES induziu alterações motoras progressivas evidenciadas através do teste de catalepsia a partir do 16º dia. Da mesma forma, ocasionou alterações na resposta nociceptiva dos ratos evidenciadas no teste do von Frey eletrônico e no teste da formalina, as quais ocorreram a partir do 10º dia, ou seja, antes das alterações motoras. A força muscular, avaliada através do teste de força de preensão, não se alterou com o tratamento. Alterações na função auditiva foram observadas no 8º dia de tratamento. Neuroquimicamente, no 10º dia, o tratamento repetido com a RES induziu diminuição na quantidade de células TH+ na substância negra parte compacta (SNpc) e na área tegmental ventral (do inglês *ventral tegmental área* – VTA) e não alterou os níveis de TH no estriado. Quanto à imunomarcação para c-FOS, o estímulo nocivo provocou aumento na quantidade de células c-FOS+ nas regiões do núcleo dorsal da rafe (NDR), substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *periaqueductal gray* – PAG) e no bulbo rostro ventromedial (do inglês, *rostral ventromedial medulla* – RVM), após o tratamento repetido com a RES, no 10º dia. Concluímos que alterações nociceptivas precedem as alterações motoras, enquanto a força permanece inalterada no modelo progressivo de parkinsonismo induzido por repetidas e baixas doses de RES, reforçando a ideia de que a dor seja um dos sinais precoces da DP. Além disso, animais com parkinsonismo se mostraram mais suscetíveis às alterações auditivas por exposição aos ruídos ambientais, sugerindo uma possível relação entre a DP e a predisposição à perda de audição, inclusive em fase pré-motora da doença.

Descritores: Doença de Parkinson; Reserpina; Nocicepção; Audição; Biomarcadores.

ABSTRACT

SENSORY FUNCTIONS IN A PROGRESSIVE MODEL OF PARKINSONISM, Rachel Rocha Cintra, São Cristóvão, 2015.

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder of movement, which affects 1% of the population over 65 years and 4% to 5% of the population over 75 years. Currently, it is known that the disease is not only characterized by motor abnormalities, but also by a set of non-motor abnormalities that precede perhaps over several years, in pre-clinical phase of the disease. Studies in the premotor phase of PD are important for the understanding of when and where the disease begins to develop and how it evolves in the early stages. Although still incipient, some studies have pointed to the presence of sensory nociceptive and auditory disorders in PD. Using an animal model of PD that takes into account the progressive nature, allows a better understanding of the relationship between the pathophysiological aspects and non-motor abnormalities of the disease and enables the exploration of temporal manifestation of these changes. The aim of this study was to evaluate the nociceptive, motor and hearing functions of Wistar rats submitted to progressive model of parkinsonism induced by low and repeated doses of reserpine (RES). In the first stage, 19 Wistar rats were used, divided into two groups (n = 9/10 per group): G1: RES (0.1 mg / kg sc) and G2: CTR (RES vehicle). The animals were subjected daily to catalepsy test and the nociceptive von Frey electronic test and received injections every 48 hours for 20 days. The grip strength test was performed on days 9, 12, 14 and 17. In the second stage, the animals were divided into two groups (n = 10/11 per group) G1: RES (0, 1 mg / kg sc) and G2: CTR (RES vehicle). The catalepsy test was performed daily and the injections were made every 48 hours. On day 8, the animals were sedated to perform the hearing test of otoacoustic emissions by distortion product (DPOAE). On day 10, the nociceptive formalin test was performed, and 60 minutes later, each animal was anesthetized, perfused and their brains removed for subsequent immunohistochemical analysis for tyrosine hydroxylase (TH) and c-FOS. Repeated treatment with RES induced progressive motor abnormalities evidenced by catalepsy test from the 16th day. Likewise, induced changes in the nociceptive response of rats evidenced in electronic von Frey test and the formalin test, which occurred on the 10th day, i.e, before the motor changes. Muscle strength as measured by grip strength test, did not change with treatment. Changes in the auditory function were observed on the 8th day of treatment. Neurochemically on the 10th day, repeated treatment with the RES induced a decrease in the number of TH+ cells in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and the ventral tegmental area (VTA) and not changed TH levels in the striatum. Regarding the immunostaining for c-FOS, noxious stimulation caused an increase in the number of cells c-FOS+ in the dorsal raphe nucleus (NDR), periaqueductal gray (PAG) and rostral ventromedial medulla (SVR) after repeated treatment with the RES, on the 10th day. We conclude that nociceptive changes precede motor changes, while the strength remains unchanged in the progressive model of parkinsonism induced by low and repeated doses of RES, reinforcing the idea that pain is one of the early signs of PD. In addition, animals with parkinsonism were more susceptible to hearing loss due to exposure to environmental noise, suggesting a possible link between the DP and the predisposition to hearing loss, including the premotor phase of the disease.

Keywords: Parkinson's disease; Reserpine; Nociception; Audition; Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do circuito dos núcleos da base.....10

Figura 2: Representação esquemática do circuito modulatório da dor.....18

Figura 3: Rato Wistar na barra de catalepsia.....32

Figura 4: Rato Wistar no teste de força de preensão. 33

Figura 5: Rato Wistar no teste do von Frey eletrônico.....34

Figura 6: Resposta nociceptiva de lambida da pata no teste da formalina. 35

Figura 7: Rato Wistar, sedado, no teste de otoemissões acústicas por produtos de distorção. 36

Figura 8: Representação esquemática do experimento 1.....37

Figura 9: Representação esquemática do experimento 2.....38

Figura 10: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) no comportamento de catalepsia.. 42

Figura 11: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na força de preensão ..43

Figura 12: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na resposta nociceptiva para o estímulo mecânico 44

Figura 13: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) no comportamento de catalepsia 44

Figura 14: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) no comportamento nociceptivo para o estímulo químico.....46

Figura 15: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na amplitude da resposta coclear de otoemissões acústicas por produtos de distorção 47

Figura 16: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na densidade óptica relativa no estriado.....48

Figura 17: Imagens representativas da imunomarcação para TH no estriado dorsal dos animais tratados repetidamente com veículo (CTR) ou RES. 48

Figura 18**:** Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na quantidade de células TH+ em (A) SNpc e (B) VTA 49

Figura 19: Imagens representativas da imunomarcação para TH na SNpc e na VTA dos animais tratados repetidamente com RES ou veículo (CTR) 50

Figura 20: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na quantidade de células c-FOS+ em (A) vlPAG, (B) RVM e (C) NDR, após o estímulo nociceptivo 51

Figura 21: Imagens representativas da imunomarcação para c-FOS no NDR, na PAG e no RVM dos animais tratados repetidamente com RES ou veículo (CTR), após estímulo nociceptivo. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACTH	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BLA	Basolateral amigdala
CCE	Células ciliadas externas
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CeA	*Central nucleus of the amigdala*
CEPA	Comitê de ética em pesquisa
CCI	Células ciliadas internas
COS	Complexo olivar superior
CPu	Núcleo caudado-putâmen
CS	Colículo superior
CTR	Controle
DA	Dopamina
dB	Decibel
DO	Discriminação olfativa
DOR	Densitometria óptica relativa
DP	Doença de Parkinson
DRt	*Dorsal reticular nucleus*
EPM	Erro padrão da média
G	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
IASP	*International Association for the Study of Pain*
LA	*Lateral amigdala*
LC	*Locus coeruleus*
MAO	Monoamina oxidase
ME	Medula espinhal
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MSN	*Medium-spiny projection neurons*
NA	Noradrenalina
NB	Núcleos da base
NC	Núcleo caudado
NR	Núcleos da rafe
NDR	Núcleo dorsal da rafe
OEA	Otoemissões acústicas
OEAPD	Otoemissões acústicas por produto de distorção

PAG	*Periaqueductal gray*
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato salina
PFA	Paraformaldeído
RES	Reserpina
RVM	*Rostral ventromedial medulla*
S.c.	Subcutânea
SM	Sintomas motores
SN	Substância negra
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra parte compacta
SNM	Sintomas não motores
SNr	Substância negra reticulada
TOL	Trato olivococlear lateral
TOM	Trato olivovoclear medial
TE	Tronco encefálico
TH	Tirosina hidroxilase
UFS	Universidade Federal de Sergipe
vlPAG	*Ventrolateral periaqueductal gray*
VMAT	*Vesicular monoaminas transporter*
VTA	*Ventral tegmental area*

SUMÁRIO

RESUMO vii

ABSTRACT viii

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xi

SUMÁRIO xiii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DA LITERATURA 5

2.1. Doença de Parkinson 5

2.1.1. Descrição, Incidência, Prevalência 5

2.1.2. Classificação e Etiologia 6

2.1.3. Fisiopatologia 7

2.1.4. Sintomas Motores 11

2.1.5. Sintomas Não Motores 12

2.2. Parkinson e Nocicepção 15

2.2.1. Nocicepção e os Núcleos da Base 22

2.2.2. Nocicepção e as Monoaminas 23

2.3. Parkinson e Audição 24

2.4. Modelo Animal da DP Induzido por Reserpina (RES) 26

3. OBJETIVOS 29

3.1. Objetivo Geral 29

3.2. Objetivos Específicos 29

4. MATERIAIS E MÉTODOS 30

4.1. Animais 30

4.2. Drogas 30

4.3. Procedimentos Gerais 30

4.4. Modelo Progressivo de DP Induzido pela Administração Repetida de Baixas Doses de Reserpina (RES) 31

4.5. Testes 31

4.5.1. Teste de Catalepsia 31

4.5.2. Teste de Força de Preensão *(Grip Strength* T*est)* 32

4.5.3. Teste von Frey Eletrônico 33

4.5.4. Teste da Formalina 34

4.5.5. Teste de Otoemissões Acústicas por Produto de Distorção (OEAPD) 35

4.6. Delineamento Experimental 36

4.6.1. Experimento 1 37

4.6.2. Experimento 2 37

4.8. Perfusão dos Animais 38

4.9. Análise Imunohistoquímica para TH e c-FOS 39

4.10. Contagem de Células 40

4.11. Densidade Óptica Relativa – DOR 40

4.12. Análise Estatística 41

5. RESULTADOS 42

5.1. Experimento 1 42

5.1.1. Comportamento de Catalepsia 42

5.1.3. von Frey eletrônico 43

5.2. Experimento 2 44

5.2.1. Comportamento de Catalepsia 44

5.2.2. Teste da Formalina 45

5.2.4. Teste de OEAPD 45

5.3. Imunohistoquímica 48

5.3.1. Densitometria óptica relativa – DOR 48

5.3.2. Contagem de células 49

5.3.2.1. Tirosina Hidroxilase (TH) 49

5.3.2.2. c-FOS 50

6. DISCUSSÃO 53

7. CONCLUSÃO 64

REFERÊNCIAS 65

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. Trata-se de um processo natural resultante de alterações morfológicas e fisiológicas que podem, por sua vez, levar a doenças. Dentre os distúrbios neurológicos que se apresentam nas faixas etárias mais avançadas estão a doença de Alzheimer, as demências com corpos de *Lewy* e a Doença de Parkinson (DP).

A DP é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum, depois da doença de Alzheimer, afetando cerca de 1% da população com mais de 65 anos e 4% a 5% da população acima de 75 anos, com incidência maior entre os homens (POLYMEROPOULOS et al., 1996).

Considerando o envelhecimento inexorável das populações, espera-se que a DP torne-se paulatinamente uma carga sócio econômica cada vez mais presente nos orçamentos públicos dos países (DE LAU; BRETELER, 2006). Segundo o Ministério da Saúde, como é uma doença progressiva, que usualmente acarreta incapacidade grave após 10 a 15 anos do seu início, o impacto social e financeiro é elevado, particularmente na população mais idosa (BRASIL, 2010). Estima-se que, em 2020, aproximadamente 40 milhões de pessoas no mundo terão desordens motoras secundárias à DP (LANA et al., 2007).

Inúmeros estudos foram desenvolvidos para melhor compreensão dos aspectos fisiopatológicos da DP. De acordo com Limongi (2001), desde a época da descoberta da doença, decorridos quase 200 anos, a descrição dos sintomas e sinais clínicos não se modificou e a necessidade de aprofundamento epidemiológico, etiológico e terapêutico da doença ainda é patente (KHANDHAR; MARKS, 2007).

Sinais cardinais, predominantemente motores, tais como tremores, rigidez muscular, instabilidade postural e bradicinesia caracterizam a doença e resultam da perda progressiva e irreversível de neurônios dopaminérgicos situados na substância negra parte compacta (SNpc) (CENTONZE et al., 1999). Esses sintomas aparecem quando 60% a 80% dos neurônios nigroestriatais já estão destruídos (BEZARD; PRZEDBORSKI, 2011; HORNYKIEWICZ, 1998; TEIVE, 2005; TISSINGH, 1998; SHARMA et al., 2013).

Embora a DP seja classicamente definida como uma desordem motora, sintomas não motores (SNM) também são observados com frequência. São sintomas de várias naturezas, tais como disfunções autonômicas, alterações sensoriais, distúrbios neuropsiquiátricos e emocionais, desordens do sono, fadiga, entre outros (BONNET et al., 2012; GARCIA-RUIZ et al., 2014).

Vários estudos revelam alterações cognitivas que acometem com frequência os pacientes com DP, tais como, perda progressiva de memória e/ou demência (SCHAPIRA et al., 2006; VOON; FOX, 2007; WOOD, 2012), déficits de memória espacial (DE LEONIBUS et al., 2007), déficits de atenção (BRONNICK et al., 2006), alterações na aprendizagem e na memória de reconhecimento (HIGGINSON et al., 2005). As alterações psiquiátricas podem estar associadas a quadros de alucinações visuais e auditivas (INZELBERG et al., 1997). Distúrbios sensoriais e dores são queixas comuns, que podem ser graves e podem ocorrer independentes da rigidez muscular, dos efeitos das drogas ou de outras causas identificáveis (SCHOT, 1985). Sintomas como depressão, desordens olfatórias, alterações no sono, constipação e dor podem aparecer em estágios iniciais ou preceder os sintomas motores (SM) em vários anos, na fase pré-clínica da doença (BONNET et al., 2012).

Atualmente, o diagnóstico da DP é feito através da presença dos sintomas cardinais motores, associados aos SNM (GOLDSTEIM et al., 2011). O desenvolvimento de técnicas de neuroimagem e de testes biológicos, pouco acrescentaram, na verdade, ao diagnóstico, que continua sendo essencialmente clínico (LIMONGI, 2001). Da mesma forma, apesar do avanço científico referente à DP, o tratamento ainda não é capaz de impedir o caráter progressivo da doença, sendo eficaz, apenas, em retardar a velocidade do processo degenerativo (SANTOS, 2012).

Por se tratar de uma desordem neurodegenerativa progressiva, a DP não se manifesta de repente e ao acaso. Ainda que a doença não esteja clinicamente evidente – já que os SM ainda não se manifestaram – a neurodegeneração já pode estar em curso. Esta fase é considerada pré-sintomática (POSTUMA, 2010) ou pré-motora (TOLOSA et al., 2007). Uma série de estudos vem apontando que alguns SNM podem se manifestar nesse período (POSTUMA, 2010; TOLOSA et al., 2007;).

Dessa forma, alterações sensoriais podem ser sugeridas como biomarcadores precoces da DP, sendo que novas descobertas sobre esses sintomas são necessárias para facilitar o diagnóstico da DP em estágios iniciais, na fase pré-motora, para um melhor monitoramento da progressão da doença e melhores possibilidades de resposta às terapias existentes e a futuras terapias, incluindo os fatores neuroprotetores (MOLLENHAUMER, 2010; POSTUMA, 2010; SCHLOSSMACHER, 2010).

Alguns estudos têm apontado para a presença de alterações sensoriais, nociceptivas e auditivas, na DP (LAI et al., 2014; TRUINI et al., 2013).

O papel da dor na fisiologia humana é, de modo geral, muito importante, funcionando como um dos principais sintomas clínicos de alerta para a detecção de algo que ameaça a

integridade física do organismo. Tal importância colocou-a como o 5º sinal vital, descrito pela Agência Americana de Pesquisa e Saúde Pública e a Sociedade Americana da Dor (SOUSA, 2002). Cinco tipos diferentes de dor foram descritos em pacientes com DP: dor musculoesquelética, consequência da rigidez parkinsoniana; dor causada por doença reumatológica ou por deformação do esqueleto; dor radicular neuropática; dor distônica relacionada aos medicamentos antiparkinsonianos e dor neuropática central, ainda sem explicações definidas (FORD, 1998; CHAUDHURI, 2009). A prevalência de dor nos parkinsonianos aumenta com a idade, o que é bastante relevante, posto que a maioria dos pacientes com a doença encontra-se na faixa etária mais avançada (LOC; KAASA, 1998).

A audição, por sua vez, é um importante sentido que permite ao ser humano compreender e se relacionar com a sociedade e com o meio ambiente. Alguns estudos revelam que funções auditivas como a lateralização dos sons (LEWALD et al., 2012) e a análise e interpretação da informação auditiva (MIRANDA et al., 2004) encontram-se alteradas em pacientes com DP.

Estudos na fase pré-motora da DP são importantes para o nosso entendimento sobre quando e como a doença começa a se desenvolver e como ela evolui nos estágios iniciais. O diagnóstico da DP na fase pré-motora permanece ainda evasivo, mas as informações disponibilizadas nesse período devem orientar a busca de biomarcadores preditivos e a identificação de fatores de risco ou de proteção relacionados com a doença (LANG, 2011; TOLOSA et al., 2007).

Nesse sentido, estudos com modelos animais podem contribuir para o melhor esclarecimento da relação entre as alterações não motoras e a DP e para a descoberta de biomarcadores sensoriais seletivos e específicos para um diagnóstico precoce e diferencial da doença. A utilização de um modelo animal da DP que considere sua natureza progressiva possibilita uma melhor compreensão das inter-relações entre os aspectos fisiopatológicos e os SNM presentes na doença e viabiliza a exploração temporal da ocorrência desses sintomas. Diante desta perspectiva, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos voltados para a análise dos parâmetros não motores observados no modelo da DP desenvolvido por Fernandes et al. (2012) e Santos et al. (2013), nos quais a indução é realizada através da administração repetida de baixas doses de reserpina (RES). Através desse modelo de parkinsonismo, já foi possível observar a ocorrência de alterações cognitivas e de memória na fase pré-motora da doença (FERNANDES, et al., 2012). Nossos novos estudos permitirão, através da exploração desse modelo, a descoberta de outros sintomas pré-motores, com a possibilidade de determinar o momento em que esses ocorrem na progressão fisiopatológica

da doença, bem como as alterações neuroquímicas associadas, favorecendo a determinação de biomarcadores precoces.

Desta forma, no presente estudo, apresentamos uma breve revisão sobre alguns aspectos motores e sensoriais envolvidos na DP e investigamos possíveis alterações na nocicepção e na função auditiva no modelo experimental crônico da DP, induzido com doses baixas e repetidas de reserpina (RES).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doença de Parkinson

2.1.1. Descrição, Incidência, Prevalência

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, em sua clássica publicação "*Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante*". Nesse trabalho, o médico inglês classificou a patologia como uma "paralisia agitante" e descreveu as principais características clínicas dessa desordem neurodegenerativa comum do movimento. Depois disso, o neurologista francês Jean Martin Charcot, admirado com a descrição de James Parkinson, rebatizou a patologia de *"Maladie de Parkinson"*, nome pela qual é conhecida até hoje (BARROS et al., 2006).

É uma doença de caráter crônico e progressivo, que afeta aproximadamente 1% da população com idade superior a 65 anos, e aumenta sua prevalência com o avançar da idade. As estimativas de incidência e prevalência relacionadas à DP podem variar, principalmente, devido às diferenças metodológicas adotadas pelos diversos estudos (CHEN; TSAI, 2010; DE LAU; BRETELER, 2006).

Tanner e Aston (2000) observaram incidências que aumentam drasticamente de 10/100.000 habitantes aos 50 anos, para 200/100.000 habitantes aos 80 anos. Segundo Limongi (2001), a cada ano, ocorrem 20 novos casos por 100.000 habitantes. O mesmo autor considera a DP uma doença cosmopolita, uma vez que não apresenta distinção entre classes sociais e raças, acometendo homens e mulheres, principalmente, na faixa etária entre 55 e 65 anos, porém tendendo a ocorrer com maior frequência nos homens.

Eeden et al. (2003), em sua pesquisa, que objetivou estimar a incidência de DP por idade, gênero e etnia, realizada entre os anos de 1994 e 1995 na Califórnia, revelaram uma incidência de 13,4/100.000 indivíduos. Esta incidência cresceu rapidamente com o aumento da idade (acima dos 60 anos), com apenas 4% dos casos identificados abaixo dos 50 anos. A taxa para homens (19/100.000) foi 91% maior do que para mulheres (9,9/100.000). A taxa de idade e gênero por 100.000 foi maior entre os hispânicos (16,6), seguida por brancos não hispânicos (13,6), asiáticos (11,3) e negros (10,2).

No Brasil, segundo estimativas de Barbosa et al. (2006), a prevalência é de 3,3% entre os indivíduos idosos, assemelhando-se a alguns países europeus e o aumento na expectativa de vida pode agravar ainda mais esse quadro.

2.1.2. Classificação e Etiologia

Parkinsonismo é um termo genérico que designa um grupo de várias doenças. Trata-se de uma síndrome caracterizada por tremor de repouso, lentidão ou diminuição dos movimentos voluntários, instabilidade postural e rigidez (BARBOSA; SALLEM, 2005; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Segundo Barbosa e Sallem (2005), existem duas formas fragmentárias de parkinsonismo que podem ser divididas em rígido-acinética (presença de acinesia e/ou rigidez) e hipercinética (presença apenas do tremor).

As diversas formas de parkinsonismo podem ser classificadas em três tipos básicos: parkinsonismo primário (doença de Parkinson idiopática e as formas hereditárias); parkinsonismo secundário; e parkinsonismo atípico (LIMONGI, 2001). O parkinsonismo primário, que é a forma mais frequente, refere-se à DP propriamente dita. Seu diagnóstico pressupõe a exclusão das outras duas formas e suas causas ainda são discutidas (BARBOSA; SALLEM, 2005). Nem todas as formas de parkinsonismo são neurodegenerativas, mas o parkinsonismo primário, sim (SCHLOSSMACHER; MOLLENHAUER, 2010). Cerca de 75% de todas as formas de parkinsonismo são do tipo primário (DP) (LIMONGI, 2001). Os casos da doença com início antes dos 40 anos são denominados parkinsonismo de início precoce. O parkinsonismo secundário é aquele que decorre de alguma causa identificada e o parkinsonismo atípico, ao contrário do que ocorre com a DP, geralmente instala-se de forma simétrica e responde mal a drogas de efeito antiparkinsoniano, inclusive a levodopa (BARBOSA; SALLEM, 2005).

A DP é uma condição complexa de etiologia multifatorial, onde vários fatores de risco interagem, provavelmente, com outros fatores protetores, tendo como base um pano de fundo genético específico (PEREIRA; GARRET, 2010). Contudo, em cerca de 95% dos casos, parece não haver uma associação genética. São casos referidos como “Parkinson esporádico” (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Apesar disso, grande parte dos estudos sobre a doença aponta a existência de uma associação entre fatores genéticos e ambientais em sua determinação. Greenamyre e Hastings (2004) descreveram os mecanismos mais importantes por trás da perda seletiva de células dopaminérgicas na DP. Dentre eles, encontram-se os agentes químicos ambientais, a interrupção da atividade do complexo I mitocondrial, o

estresse oxidativo e as alterações na agregação de proteínas (estresse proteolítico) (GREENAMYRE; HASTINGS, 2004; TEIVE, 2005).

A descoberta dos genes relacionados com a DP renovou o interesse pelos fatores de suscetibilidade hereditária (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003), embora todas as diferentes causas genéticas identificadas até o momento respondam por menos de 5% dos casos, chamados de formas familiares da doença (STANDAERT; GALANTER, 2009). Assim, até o momento, a etiologia da doença é controversa. Supõe-se, contudo, a participação de vários mecanismos etiopatogênicos que poderiam ser responsáveis pela neurodegeneração na DP.

2.1.3. Fisiopatologia

Mais de um século se passou desde a descrição por James Parkinson e a descoberta da característica central da DP: a perda de neurônios da SNpc. O ritmo das descobertas evoluiu de forma mais consistente, no entanto, a partir de 1958, com a descoberta, no cérebro de mamíferos, da dopamina (DA), neurotransmissor essencial no controle dos movimentos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A DA pertence à família das catecolaminas, derivadas do aminoácido tirosina. Os principais núcleos produtores de dopamina no sistema nervoso central (SNC) são a SNpc, a área tegmental ventral (do inglês, *ventral tegmental área* [VTA]) e alguns núcleos hipotalâmicos (núcleo arqueado no hipotálamo médio basal e núcleos periventriculares). As projeções de feixes de fibras desses núcleos formam as quatro principais vias dopaminérgicas: via nigroestriatal (projeções da SNpc até o núcleo caudado-putamen [CPu]), via mesocortical (projeções de VTA até o córtex pré-frontal), via mesolímbica (projeções de VTA até o núcleo accumbens [NA] no sistema límbico), via tuberoinfundibular (projeções do hipotálamo até a eminência mediana na hipófise) (STANDAERT; GALANTER, 2009).

Os marcadores patológicos da DP são a perda dos neurônios dopaminérgicos nigtroestriatais e a presença de "corpos de *Lewy*", inclusões citoplasmáticas proteicas, formadas principalmente pelas proteínas α-sinucleína, parkina e ubiquitina, e que são responsáveis por processos de toxicidade e morte celular, principalmente dos neurônios dopaminérgicos (BOVÉ et al., 2005; KOO et al., 2008). A perda desses neurônios, que normalmente contém quantidades visíveis de neuromelanina, produz o clássico achado neuropatológico de despigmentação da SNpc e provoca forte redução nos níveis de DA nas estruturas que recebem suas projeções (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Os corpos celulares dos neurônios nigroestriatais (localizados na SNpc) projetam seus axônios para o corpo estriado. O corpo estriado é formado pelo núcleo lentiforme (globo pálido [GP] e putâmen [Pu]) e pelo núcleo caudado (NC), e representa um dos núcleos da base (NB). Os NB são estruturas localizadas profundamente no cérebro, que compõem o diencéfalo, e estão envolvidas, entre outras atividades, no controle dos movimentos (GOBBI, et al., 2006).

A DA é um neurotransmissor crítico na atividade estriatal (GALVAN, et al., 2015) e sua deficiência leva a alterações funcionais no circuito dos NB, provocando o aparecimento dos principais sinais e SM da DP (BARBOSA; SALLEM, 2005).

Anatomicamente, os NB formam uma espécie de alça. Os impulsos de inúmeras regiões corticais, topograficamente distribuídos, chegam até eles através do estriado. Do estriado, saem projeções para os demais NB que, através do tálamo, devolvem a informação processada ao córtex, principalmente para as áreas pré-frontais e motoras (área motora primária e área motora suplementar) (GALVAN et al., 2015; GOBBI, et al., 2006). Esta ligação estabelecida entre os NB, tálamo e áreas corticais é responsável por recolher informações sensoriais de todo o corpo e integrá-las em sinais que posteriormente controlam e corrigem a ação muscular. Por esta razão, esses núcleos são classicamente associados às funções motoras, havendo, entretanto, várias evidências de que eles participam também de outras dimensões do comportamento humano, cognitivas e sensitivas (TEIXEIRA, et al., 2004), dentre as quais, a atenção seletiva (BARKER, 1988) e a modulação da sensibilidade dolorosa (CHUDLER; DONG, 1995).

Lidsky et al. (1985), em sua revisão sobre o funcionamento dos NB, apontaram que o estriado é a principal porta de entrada desses núcleos e é responsável por grande parte do processamento da informação que chega até eles. Projeções nigrais, que são dopaminérgicas (excitatórias ou inibitórias, a depender do receptor), e corticais que são glutamatérgicas (excitatórias), dirigem-se para o estriado. Do estriado, partem projeções GABAérgicas (inibitórias) em direção ao GP e à substância negra reticulada (SNr) (GALVAN et al., 2015; STANDAERT; GALANTE, 2009).

Os receptores de DA, de maneira geral, são divididos em duas classes: a classe D1, formada pelos receptores D1 e D5, com características excitatórias, e a classe D2, composta pelos receptores D2, D3 e D4, caracteristicamente inibitórios. Os receptores D1 e D2 são expressos em altos níveis no estriado, onde desempenham papel no controle motor dos NB (STANDAERT; GALANTE, 2009). Os neurônios do estriado emitem suas projeções para dois alvos distais, formando a via direta e a via indireta (GOBBI, et al., 2006) (Figura 1). O

estriado possui, também, interneurônios que participam na intercomunicação entre as estas duas vias (GALVAN et al., 2015; STANDAERT; GALANTE, 2009).

A ação dopaminérgica no estriado promove simultaneamente a ativação da via direta, através dos receptores do tipo D1 e a inibição da via indireta através da estimulação dos receptores do tipo D2. O equilíbrio de atividade entre as vias direta e indireta regula o movimento (GOBBI, et al., 2006).

A via direta conecta o estriado, através de projeções GABAérgicas, ao globo pálido interno (GPi) e SNr (núcleos de saída dos NB). Esses núcleos de saída exercem uma inibição tônica sobre o tálamo através de projeções também GABAérgicas. A via direta atua facilitando o movimento ao inibir os núcleos de saída, que por sua vez desinibem o tálamo, que possui projeções glutamatérgicas que ativam o córtex motor (GALVAN et al., 2015).

A via indireta, por sua vez, começa no estriado através de projeções GABAérgicas para o globo pálido externo (GPe). Em seguida, comunica-se com o núcleo subtalâmico (NST) através de neurônios também GABAérgicos, e só depois chega aos núcleos de saída através de projeções glutamatérgicas. Esta via exerce atividade inibitória sobre o movimento, na medida em que, as projeções GABAérgicas para o GPe ativam os núcleos de saída, que por sua vez, inibem o tálamo, o qual diminui a excitação do córtex motor (GALVAN et al., 2015).

A via nigroestriatal dopaminérgica modula a atividade das vias direta e indireta. Nesse sentido, a DA tem ação facilitadora sobre o movimento, já que ela ativa a via direta através dos receptores D1 e inibe a via indireta através dos receptores D2. Com a diminuição dos níveis de dopamina na DP, há uma diminuição da ativação da via direta (facilitadora do movimento) e um aumento da ativação da via indireta (inibidora do movimento), resultando no aumento da atividade GABAérgica sobre os núcleos de saída, levando a uma inibição excessiva dos sistemas motores tálamo-corticais (BRAAK; DEL TREDICE, 2008; GALVAN et al., 2015; TEIVE, 2005), clinicamente ocasionando a hipocinesia (diminuição do movimento) (BRAAK, DEL TREDICE, 2008).

Paralelamente, na DP, além da via nigroestriatal, pode ocorrer a degeneração de outras vias dopaminérgicas, como a via mesolímbica, a via mesocortical e a via tuberoinfundibular (CHUDLER; DONG, 1995). Essas vias estão envolvidas com vários comportamentos como a cognição, o sono e a dor (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009).

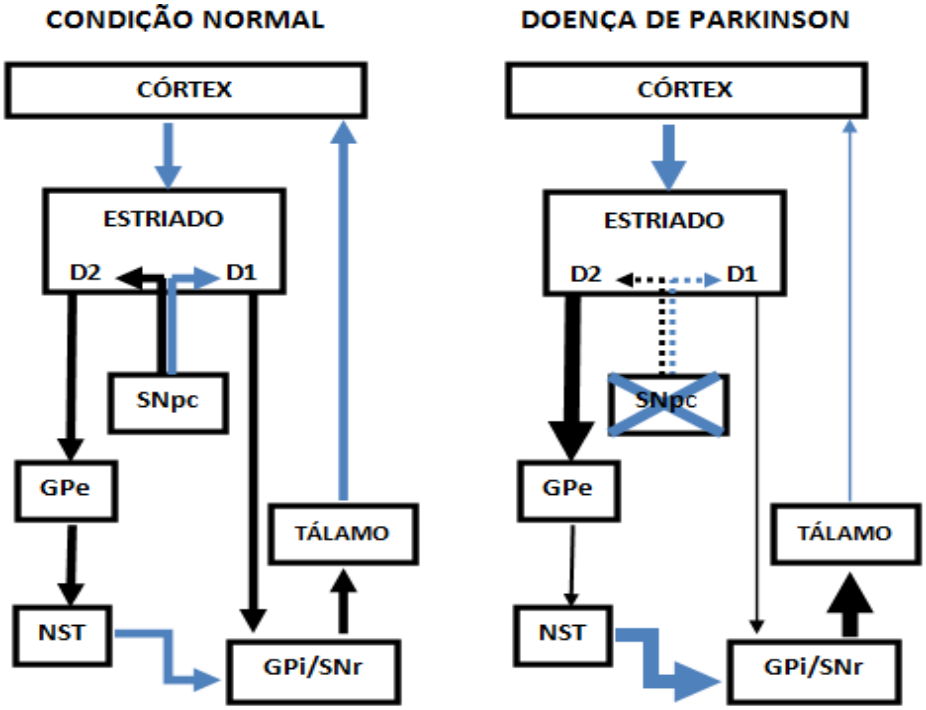

Figura 1: A figura representa o fluxo de saída do estriado e seu significado funcional na DP. As setas azuis representam projeções excitatórias (glutamatérgicas ou dopaminérgicas via receptores D1) e as setas pretas, projeções inibitórias (GABAérgicas ou dopaminérgicas via receptores D2). O circuito representado à esquerda reproduz a condição de funcionamento normal e o da direita representa o que ocorre na DP. D1, receptor D1; D2, receptor D2; SNpc, substância negra parte compacta; GPe, globo pálido externo; NST, núcleo subtalâmico; GPI, globo pálido interno; SNr, substância negra reticulada. Fonte: adaptada de: http://what-when-how.com/acp-medicine/parkinson-disease-and-other-movement-disorders-part-1/

Outra característica comum da DP é a neurodegeneração em outros NB não dopaminérgicos (GALVAN, et al., 2015), e fora do circuito dos NB, em sistemas noradrenérgicos (*locus coeruleus* [LC]) (BRAAK et al., 2003), serotoninérgicos (núcleos da rafe [NR]) (HOUT; FOX, 2013; McDONALD, et al., 2003), colinérgicos (núcleos basais de Meynert e núcleo motor dorsal do vago) (CASH, et al., 1984) e GABAérgicos (CHUDLER; DONG, 1995), bem como no córtex cerebral (especialmente nos córtex cingulado e entorrinal), no bulbo olfatório e no sistema nervoso autonômico e periférico (BRAAK; BRAAK, 2000; BRAAK et al., 2003; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). A degeneração de estruturas hipocampais e corticais colinérgicas contribui para a alta taxa de demência que acompanha a DP. As correlações clínicas com as lesões nas vias noradrenérgicas e serotoninérgicas ainda não são claramente caracterizadas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; SCHULZ; FALKENBURGER, 2004). Também não está bem estabelecida a relação temporal dos danos a sistemas neuroquímicos específicos. Alguns pacientes, por exemplo, desenvolvem depressão meses ou, até mesmo, anos antes do início dos SM. Tais quadros

depressivos podem estar indicando o envolvimento precoce de vias não dopaminérgicas na fisiopatologia da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Outra evidência na fisiopatologia da DP relaciona-se com mudanças morfológicas nos NB, especialmente no estriado. Estudos animais demonstraram mudanças morfológicas que levam a alterações no padrão de atividade desse núcleo após a depleção dopaminérgica. A principal mudança é a perda das espinhas dendríticas dos neurônios médios espinhosos de projeção (do inglês, *medium-spiny projection neurons* [MSN]) (VILALBA et al., 2009). Estudos em macacos tratados com uma neurotoxina que provoca lesões nos neurônios dopaminérgicos (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina: MPTP) mostraram que as espinhas remanescentes, juntamente com os terminais córtico e tálamo estriatais que fazem contato com elas, tiveram um acentuado aumento de volume quando comparados com os encontrados em animais normais (VILALBA; SMITH, 2011). Esse efeito corresponde, possivelmente, a um mecanismo compensatório. Estudos em camundongos transgênicos mostraram que as conexões colaterais dos MSN com as vias direta e indireta reduziram-se após a depleção dopaminérgica (TAVERNA et al., 2008). Como as espinhas dendríticas dos MSN são os principais destinatários de aferentes córtico e tálamo estriatais, é provável que a perda destas espinhas afete a transmissão glutamatérgica para o estriado (GALVAN et al., 2015).

2.1.4. Sintomas Motores

Na DP a principal manifestação clínica é a síndrome parkinsoniana, decorrente do comprometimento da via dopaminérgica nigroestriatal. A síndrome parkinsoniana apresenta, portanto, quatro sintomas básicos, tipicamente motores: rigidez, tremor, instabilidade postural e bradicinesia (BARBOSA; SALLEM, 2005). Esse conjunto de SM só se manifesta quando 60 a 80% dos neurônios dopaminérgicos já se degeneraram, o que dificulta o tratamento da DP (HORNYKIEWICZ, 1998; TEIVE, 2005; TISSINGH, 1998; SHARMA et al., 2013). Além disso, para caracterização da síndrome, pelo menos três desses sintomas são necessários (BARBOSA; SALLEM, 2005; HUGHES et al., 1992), ocasionando, muitas vezes, um diagnóstico tardio.

A rigidez é determinada por uma hipertonia que gera resistência ao movimento. A hipertonia pode ser contínua ou intermitente, provocando o efeito de “roda denteada”. Pode acometer toda a musculatura flexora, determinando alterações típicas de postura, com antero-flexão do tronco e semi-flexão dos membros (HUGHES et al., 1992; PAULSON; STERN, 2004).

O tremor parkinsoniano ocorre no repouso, exacerba-se durante a marcha, em momentos de esforço mental e em situações de tensão emocional. Diminui com a movimentação voluntária do segmento afetado e desaparece com o sono. A frequência varia de quatro a seis ciclos por segundo e costuma envolver preferencialmente as mãos, configurando a alternância entre pronação e supinação ou flexão e extensão dos dedos (HUGHES et al., 1992; PAULSON; STERN, 2004).

A instabilidade postural decorre da perda de reflexos de readaptação da postura e configura um distúrbio que não é comum em fases iniciais de evolução da DP. Com a progressão do processo neurodegenerativo, pode agravar-se, determinando quedas frequentes (FEARNLEY; LEES, 1991). Frazzitta et al. (2015) apontam que a fraqueza muscular é uma frequente causa de instabilidade que contribui para quedas na DP, mas apenas poucos estudos voltados para a avaliação da força muscular foram realizados em pacientes com Parkinson.

Outros SM frequentes são a bradicinesia (lentidão nos movimentos), a hipocinesia (redução na amplitude dos movimentos) e a acinesia (pobreza de movimentos). O distúrbio motor relacionado à acinesia é a aceleração involuntária na execução de movimentos automáticos (festinação) que ocorre especialmente na marcha (HUGHES et al., 1992). Pode ocorrer, também, a acinesia súbita ou congelamento (do inglês, *freezing),* caracterizada pela perda repentina da capacidade de iniciar ou sustentar um movimento específico, ocorrendo mais frequentemente durante a marcha. E, ainda, o fenômeno de cinesia paradoxal, que representa a melhora abrupta e de curta duração do desempenho motor, quando sob forte emoção. A acinesia súbita e a cinesia paradoxal, ao contrário da acinesia, que é dependente do déficit dopaminérgico, parecem estar relacionadas a oscilações de atividade noradrenérgica (HUGHES et al., 1992; PAULSON; STERN, 2004).

Outros SM que podem ocorrer são a diminuição das expressões faciais (hipomimia), a diminuição do volume vocal (hipofonia), a sialorreia (dificuldade para deglutir a saliva), a diminuição do tamanho da letra (micrografia) e a diminuição da velocidade da escrita e do comprimento do passo durante a caminhada (HUGHES et al., 1992; PAULSON; STERN, 2004).

2.1.5. Sintomas Não Motores

Tradicionalmente a DP foi definida como uma desordem fundamentalmente motora. Entretanto, uma série de SNM é descrita como parte do seu quadro clínico e, embora pareça que aspectos não motores da DP sejam uma observação recente, autores clássicos como James

Parkinson, Charcot, Gowers, Oppenheim e Wilson descreveram em seus trabalhos muitos desses sintomas (GARCIA-RUIZ et al., 2014).

Os SNM, portanto, sempre fizeram parte do quadro clínico da DP. Uma das primeiras evidências sobre a sua presença na fisiopatologia da doença apareceu com a introdução da levodopa, quando alguns autores observaram melhora dos mesmos após o tratamento com esse fármaco (GARCIA-RUIZ et al., 2014). Uma das razões para que os SNM fossem menos enfatizados que os SM na descrição da patologia, é que os SM podem ser vistos em todos os pacientes com a doença, ao passo que os SNM são bastante variados e não se apresentam necessariamente em todos os pacientes com Parkinson. Além disso, são tão devastadoras as alterações motoras decorrentes da doença, que os outros sintomas são geralmente esquecidos. Outro fato que torna os SNM muitas vezes negligenciados na prática clínica é a ausência de queixas espontâneas dos pacientes e a ausência de questionamentos sistemáticos por parte dos profissionais de saúde sobre esse tema (BONNET et al., 2012).

Todavia, estudos mostram que na DP, SNM ocorrem em mais de 90% dos pacientes entre todos os estágios da progressão da patologia e incluem uma grande variedade de alterações entre disfunções neuropsiquiátricas e emocionais, alterações autonômicas, declínios cognitivos e demência, distúrbios do sono, fadiga, desordens sensoriais e outros (BONNET et al., 2012; LANG, 2011). Assim, os SNM são comumente encontrados no quadro clínico da DP e, embora a doença seja diagnosticada classicamente pelo início insidioso das alterações motoras, evidências têm demonstrado que os SNM não só ocorrem em todos os estágios motores da DP, mas também em estágios pré-motores (GARCIA-RUIZ et al., 2014), isto é, antes do desenvolvimento de acinesia, rigidez e tremor (BONNET et al., 2012). Apesar disso, pouco se sabe sobre como eles se instalam, progridem e contribuem para a deterioração da qualidade de vida no decorrer da doença (TRUINI et al., 2013).

Embora nenhum desses sintomas seja específico da DP, quando combinados, eles podem, eventualmente, melhorar a nossa capacidade de identificar indivíduos com elevado risco para desenvolver a DP ou indivíduos que se encontram numa fase precoce da patologia (CHEN et al., 2011). Assim, pesquisas sobre esse tema podem, eventualmente, levar ao diagnóstico precoce da doença, a uma melhor condução clínica e a uma melhor compreensão da história natural e da patofisiologia da DP (CHEN et al., 2011).

Alguns dos SNM, como a desordem do comportamento do sono REM (do inglês, *rapid eye moviments*), a anosmia, a constipação, a depressão e a dor, são reconhecidamente sintomas que podem preceder os SM durante anos ou até mesmo décadas em pacientes ainda não diagnosticados e não tratados (BONNET et al., 2012; CHAUDURI et al., 2006; TOLOSA

et al., 2009; TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011). Outras características, ainda pouco estudadas e reconhecidas como pré-motoras, também são sugeridas na DP: ansiedade, apatia, fadiga, dores não-específicas, sonolência diurna excessiva, obesidade de meia-idade, tempo de reação lento, distúrbios visuais, alteração na discriminação de cor, disfunção erétil, mudanças cognitivas, síndrome das pernas inquietas e mudanças de personalidade (BONNET et al., 2012; TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011).

Como já mencionado, os SM característicos da DP decorrem degeneração neuronal nigroestriatal, ao passo que, a maioria dos SNM não. Esses estão associados à redução neuronal presente em outras áreas, tais como a VTA, o LC, os NR e o núcleo basal de Meynert (núcleo basal magnocelular/substância inominada). Portanto, déficits de outros neurotransmissores (noradrenalina, serotonina e acetilcolina) também estão envolvidos no desenvolvimento desses sintomas da doença (OBESO et al., 2010; TEIVE, 2005). Estudos de estadiamento recentemente propostos para a DP (Tabela 1) apontam que a neurodegeneração pode ocorrer inicialmente em áreas distintas da substância negra (SN). Braak et al. (2003), através da utilização de marcadores neuropatológicos da DP (como os corpos de *Lewy* e as chamadas placas neuríticas de *Lewy* imunopositivas para alfa-sinucleina) nos tecidos *post mortem* de pacientes com Parkinson, definiram a presença de seis estágios evolutivos da DP. Nos estágios iniciais, ocorre a degeneração extranigral, ocasionando sintomas de natureza não motora, e sugerindo que estas manifestações podem ser marcadores precoces da doença (LANG, 2011; POSTUMA et al., 2010; TOLOSA et al., 2007; TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011).

Tabela 1: DP e o estadiamento de Braak: A fase pré-motora da doença corresponde aos estágios 1-3

Estágio	**Áreas afetadas**
1	Bulbo raquidiano e bulbo olfatório
2	Núcleo da rafe, núcleo reticular gigantocelular e *locus coeruleus*
3	Mesencéfalo, em particular SNpc
4	Córtex medial temporal e amígdala
5	Córtices superiores associativos sensoriais (especialmente temporal e frontal)
6	Córtices primários

Fonte: Tolosa, Pont-Sunyer, 2011, adaptado de Braak et al., 2003.

Por outro lado, existem alguns SNM que podem estar relacionados com a disfunção dopaminérgica em si. Depressão, ansiedade e apatia parecem ter relação com a diminuição da transmissão dopaminérgica, ao passo que alucinações, psicose, hipomania e transtornos

compulsivos relacionam-se com o aumento da transmissão dopaminérgica decorrente do tratamento farmacológico (BONNET et al., 2012).

A recente hipótese de Braak et al. (2003), de que, na DP, a sinucleinopatia (corpos de *Lewy* e neurites) começa no tronco encefálico (TE) baixo e em estruturas olfatórias e progride seguindo um padrão caudo-rostral suporta a ideia de que alguns SNM podem anteceder os SM clássicos e fornece uma base neuroanatômica para os SNM que podem ocorrer no estágio pré-motor (TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011). A hiposmia, por exemplo, pode ser explicada pelas mudanças neuropatológicas na região do BO, a constipação pode estar associada à degeneração do núcleo dorsal do vago e as alterações do comportamento do sono REM, relacionadas com a degeneração precoce dos núcleos pedúnculo-pontinos e do LC, que juntamente com o núcleo da rafe (NR), também pode ter participação na patofisiologia da depressão na DP (TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011).

Através do estudo de estadiamento de Braak, é possível observar que a degeneração da SN só ocorre à partir do estágio 3, o que justifica a ocorrência de outros sintomas de natureza não motora antes dos SM da doença. No entanto, é possível que o estadiamento proposto por esses pesquisadores não se aplique a todos os tipos de DP (TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011). Um estudo publicado em 2008 mostrou que 47% dos 71 casos de DP avaliados não seguiu a escala de estadiamento proposta por Braak et al. (2003) (KALAITZAKIS et al., 2008). Além disso, alguns estudos de neuroimagem sugerem que, em algum momento, durante a fase pré-motora (estágios 1 e 2 de Braak), começa a ocorrer, também, a degeneração de células dopaminérgicas da SN (SOMMER et al., 2004; STIASNY-KOLSTER et al., 2005). Desta forma, as mudanças neuropatológicas precisas e os mecanismos pelos quais essas lesões resultam em sintomas pré-motores, continuam pouco esclarecidas, em função, principalmente, da carência de estudos pré-clínicos e de estudos clínicos com dados prospectivos que indiquem se a ordem dos eventos ocorre em uma maioria dos casos, com qual frequência e em qual sequência os vários sintomas atingem sujeitos com Parkinson na fase pré-motora (TOLOSA; PONT-SUNYER, 2011).

2.2. Parkinson e Nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain* [IASP]), a dor pode ser descrita como uma "experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões" (FLÓREZ, 1993). Ocorre tanto como evento sensorial do sistema

nervoso periférico e central, quanto como uma profunda experiência fenomenológica que afeta os processos de consciência e, portanto, a expressão e definição "particular" da dor (GIORDANO, 2005).

Alguns estudos descrevem o papel fisiológico da dor como um alarme que protege o organismo, ativando reações e induzindo comportamentos de precaução que podem diminuir a causa da sensação álgica e, como resultado, limitar os danos (ALMEIDA et al., 2004; COSTIGAN; WOOLF, 2000; MILLAN, 1999; WOOLF; SALTER, 2000). Nesse sentido, a função da dor é advertir sobre um possível dano tecidual e, então, proteger a vida (WHO, 2006).

Estudos de imagem sugeriram uma "matriz para a dor", ou seja, áreas cerebrais consistentemente ativadas por estímulos nocivos. Essas áreas não são restritas, mas frequentemente abrangem o córtex cingulado anterior rostral, o córtex cingulado pregenual, os córtices somatossensoriais I e II, a ínsula, a amígdala, o tálamo e a substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *periaqueductal gray* [PAG]) (TRACEY; MANTYH, 2007).

A dor, que frequentemente acompanha um dano ou o risco de dano tecidual, é uma entidade complexa e multidimensional que envolve componentes sensoriais, afetivos, motivacionais e cognitivos (ALMEIDA et al., 2004). A dimensão sensório-discriminativa da dor envolve a intensidade, a duração, a qualidade e a localização do estímulo nocivo. Os mecanismos neurais que estão por trás desta dimensão podem influenciar a direção ou a velocidade do comportamento de fuga coordenado. A dimensão motivacional-afetiva envolve respostas aversivas, emocionais e autonômicas assim como o esforço para sua redução. E a dimensão cognitiva da dor envolve o controle intencional das dimensões sensório-discriminativas e motivacionais-afetivas. Comportamentos de esquiva, ataque e socorro, são respostas motoras complexas que podem ser mediadas através dos sistemas motivacionais-afetivos (ALMEIDA et al., 2004; CHUDLER; DONG, 1995).

Um estímulo nocivo rápido e inesperado dispara uma complexa reação motora que pode se manifestar através do sobressalto, do reflexo de flexão, do reajuste postural, da vocalização, da orientação no sentido do tecido lesado e de outros comportamentos voltados para a redução da sensação de dor. Já a dor crônica pode produzir comportamentos recuperativos, tais como o repouso, que leva à redução dos movimentos (WALL, 1979).

A ativação de nociceptores periféricos – terminações nervosas livres, sensíveis à dor, que constituem os neurônios sensoriais primários para a dor induzida pela sensibilização desses receptores – gera um potencial de ação tanto pela liberação de neurotransmissores excitatórios, a exemplo do glutamato, como pela diminuição no limiar da resposta da fibra

nociceptiva e nociceptores circundantes. Desencadeia-se, assim, um potencial aferente que é conduzido até o corno posterior ou dorsal da medula espinhal (CDME), onde ocorre a primeira sinapse com um neurônio de segunda ordem, que decussa e conduz o estímulo até o tálamo através do feixe espinotalâmico. Existem, também, projeções colaterais que tem como alvo o tronco encefálico (TE) – núcleo reticular dorsal (do inglês, *dorsal reticular nucleus* [DRt]), bulbo ventromedial rostral (do inglês, *rostral ventromedial medulla* [RVM], que inclui o núcleo magno da rafe e os núcleos reticulares gigantocelulares) e a PAG. No tálamo, ocorre a segunda sinapse e o estímulo é levado até o córtex cerebral e a amígdala (lateral e basolateral). O núcleo central da amígdala (do inglês, *central nucleus of the amígdala* [CeA]) recebe aferências nociceptivas do tronco encefálico e da medula espinhal e envia suas fibras eferentes em direção ao córtex e ao tálamo (ALMEIDA et al., 2004).

Após a recepção no CDME, a informação nociceptiva das vísceras, pele e outros órgãos estão sujeitas a um extensivo processamento por diversos mecanismos que facilitam ou inibem sua transferência para centros superiores. Para isto, uma rede de vias descendentes, de importância crucial, projeta-se de estruturas cerebrais para a medula espinhal (ME) e suprimem (inibição descendente) ou potencializam (facilitação descendente) a mensagem nociceptiva (MILLAN, 2002; SUZUKI et al., 2004). Esta modulação descendente é mediada por projeções da PAG, que se comunicam com o RVM, além de outros núcleos bulbares que enviam projeções para o CDME (Figura 2).

A dor pode ser classificada como nociceptiva, neuropática ou inflamatória. A primeira, chamada nociceptiva, informa rapidamente que os estímulos do meio ambiente agridem ou colocam em perigo a integridade física do animal, e as outras comunicam a presença de alguma disfunção orgânica, ou seja, uma inflamação ou neuropatia (NETO, 2009).

A dor nociceptiva é aquela causada pela ativação dos nociceptores. Pode ser somática (quando originada na pele e no sistema musculoesquelético) ou visceral (quando originada nos órgãos viscerais). O termo nocicepção, relaciona-se à recepção do estímulo nocivo que apresenta apenas o componente sensorial, sem relação com o emocional (DICKENSON, 1997). Portanto, chama-se nocicepção, a atividade no nociceptor, a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso (DICKENSON, 1997). Assim, enquanto a dor representa uma percepção subjetiva associada a uma dimensão emocional, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações da existência de lesão ao SNC (JULIUS; BASBAUM, 2001). Enquanto o termo nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas a partir de estímulos nocivos, a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e necessita da capacidade de

abstração e elaboração do impulso sensorial (ALMEIDA et al., 2004; LOESER; MELZACK, 1999).

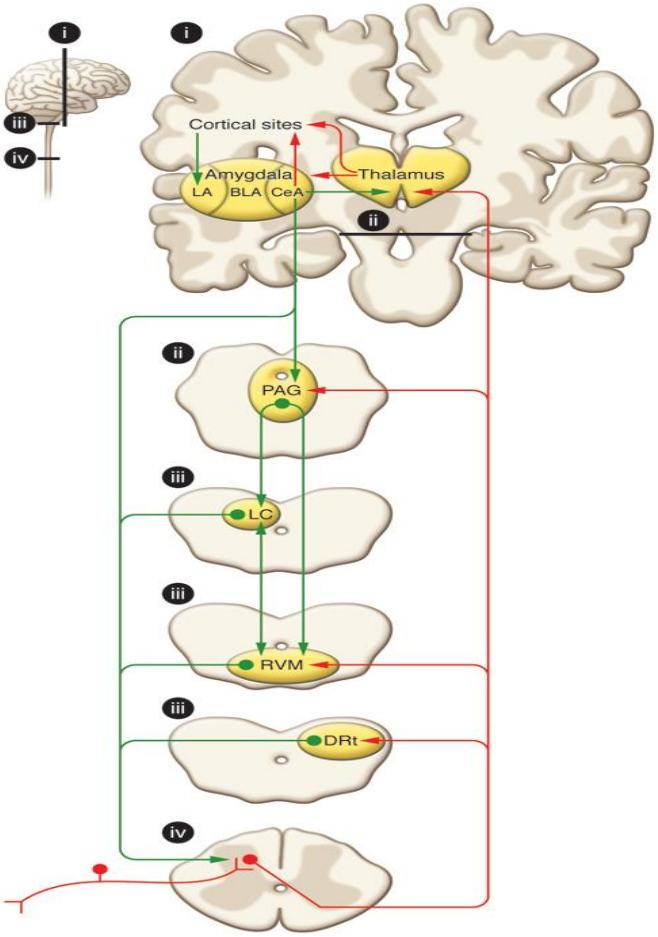

Figura 2: Representação esquemática do circuito modulatório da dor. Estímulos nociceptivos chegam ao CDME (corno dorsal da medula espinhal) através das fibras aferentes primárias, fazem sinapse com os neurônios de transmissão que projetam fibras ascendentes através do trato espinotalâmico contralateral. Essas projeções ascendentes direcionam-se para o tálamo e projeções colaterais também buscam outros núcleos mesencefálicos como o núcleo dorsal reticular (DRt), o bulbo rostral ventromedial (RVM) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG). As projeções descendentes do DRt são um componente crítico da via de controle nociceptivo inibitório descendente. As projeções rostrais do tálamo buscam áreas específicas do córtex e a amígdala. O núcleo central da amígdala (CeA) recebe informações nociceptivas do tornco encefélico (TE) e da medula espinhal (ME). Estímulos nociceptivos do tálamo e do córtex entram através da amígdala lateral (do inglês, *lateral amigdala* [LA]) e da amígdala basolateral (do inglês, *basolateral amigdala* [BLA]). O CeA envia projeções para áreas corticais e para o tálamo, onde as percepções cognitivas e conscientes de dor são integradas. A modulação descendente da dor é mediada por projeções para a PAG, que também recebe informações de outras áreas, como o hipotálamo (não representado na figura) e comunicam-se com o RVM, bem como com outros núcleos bulbares que enviam projeções para o CDME através do funículo dorsolateral. O lócus coeruleus (LC) noradrenérgico recebe projeções da PAG, comunica-se com o RVM e envia projeções noradrenérgicas inibitórias para a ME. Projeções espinopetais (originam-se no RVM e na região dorsolateral pontina e descendem pelos funículos dorsolateral e lateral para inervar o CDME) anti-nociceptivas e pró-nociceptivas vindas do RVM, modulam as informações nociceptivas positiva ou negativamente e formam um sistema regulador endógeno para a dor. Os tratos ascendentes são representados em vermelho e os tratos descendentes são representados em verde. Fonte: Ossipov et al., 2010.

A dor neuropática é causada por uma doença ou injúria no sistema nervoso e inclui várias condições crônicas (GILRON et al., 2015). Pode ser caracterizada como central ou periférica, dependendo do local da lesão (MULLA et al., 2014). É comumente uma consequência de várias condições clínicas, como o diabetes, a quimioterapia, as infecções por herpes zoster, o abuso de álcool e outras condições idiopáticas. Pacientes com dor neuropática normalmente referem queimação ou formigamento sobre a pele (SCHESTATSKY et al., 2014).

A dor inflamatória, por sua vez, resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. A dor inflamatória aguda resulta da ação de um estímulo desencadeante (mecânico, químico ou térmico) ou de um mediador, como a bradicinina, que ativa esses neurônios periféricos sensibilizados. Já a dor inflamatória crônica é o resultado de modificações funcionais nos neurônios aferentes primários produzidas por mediadores inflamatórios liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual (NETO, 2009).

Embora a dor tenha sido uma característica clínica reconhecida na DP desde as primeiras descrições de James Parkinson, sua relação exata com a patologia e a origem desse sintoma não estão claramente estabelecidas. Há ainda uma carência de pesquisas nesta área (CHUDLER; DONG, 1995; RANA et al., 2013) e poucos estudos avaliaram, de forma prospectiva, a prevalência e natureza da dor na DP (HANAGASI, 2011).

A dor afeta substancialmente a qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos e alguns pacientes referem esse SNM como mais angustiante do que os distúrbios motores (TRUINI et al., 2012). Como a DP é uma doença comumente diagnosticada em idosos e como existe alta prevalência de dor na população idosa em geral, torna-se difícil estabelecer a relação desse sintoma com a DP propriamente dita. Apesar disso, estudos mostraram que a frequência de dor é significativamente maior em amostras representativas de pacientes com DP do que em amostras pareadas da população em geral (DEFAZIO et al., 2008; NÈGRE-PAGÈS et al., 2008).

A prevalência de dor na DP tornou-se, recentemente, um foco de atenção, assim como a sua etiologia (RANA et al., 2013). Alguns estudos apontam que sua prevalência em pacientes varia entre 40% e 83% nos parkinsonianos (BEISKE et al., 2009; DEFAZIO et al., 2008; LEE et al., 2006) e que se trata do SNM mais frequente no início da doença (BONNET et al., 2012; LEE et al., 2006). Outro estudo concluiu que a dor é duas vezes mais frequente

em pacientes com Parkinson do que em indivíduos sem a doença (NÈGRE-PAGÈS et al., 2008).

A dor que ocorre na DP pode - para fins de diagnóstico e desenvolvimento de estratégias de intervenção - ser classificada numa combinação de cinco categorias clínicas diferentes: (I) dor musculoesquelética, (II) dor radicular / dor neuropática, (III) dor distônica, (IV) acatisia e, (V) dor central/primária (BEISKE et al., 2009; FORD, 2010) (Tabela 2).

De acordo com esta classificação, os pacientes com DP experimentam dois tipos diferentes de dor, a dor nociceptiva e a dor neuropática. A dor nociceptiva relacionada à DP é extremamente frequente e é tipicamente musculoesquelética e/ou visceral (WASNER; DEUSCHL, 2012).

A dor nociceptiva musculoesquelética geralmente se origina a partir da postura anormal, da rigidez e da acinesia que causam flutuações motoras, levando assim à distonia dolorosa. Esta, por sua vez, manifesta-se mais comumente no início da manhã, quando a estimulação dopaminérgica é baixa e a acinesia e rigidez são graves. O outro tipo de dor nociceptiva, não menos frequente, é a dor visceral que geralmente acompanha a constipação. (TRUINI, 2013).

A dor neuropática relacionada com a DP compreende a dor radicular (dor neuropática periférica) e dor neuropática central parkinsoniana. A dor radicular tem uma prevalência maior em pacientes com DP do que na população geral (WASNER; DEUSCHL, 2012). Esta maior prevalência decorre, provavelmente, de danos na estrutura dos discos lombares devido à festinação, à cifose e à distonia (TRUINI, 2013).

A dor diretamente relacionada com a DP (dor neuropática central, dor central parkinsoniana) é uma condição que, de acordo com um estudo realizado com 450 pacientes parkinsonianos que se submeteram a exame clínico padronizado e responderam a questionários detalhados sobre a ocorrência de dor, revelou que 39,3% dos pacientes com Parkinson apresentam dor central parkinsoniana (NÈGRE-PAGÈS et al., 2010). É uma dor que não pode ser explicada pelos fenômenos descritos por James Parkinson (QUINN et al., 1986). Esse tipo de dor apresenta-se como profundo ardor ou pontadas com ardor ou sensação de formigamento em áreas mal definidas do corpo, geralmente no lado acometido de maior disfunção motora. Os pacientes sentem uma leve sensação de tensão e mal-estar que pouco responde ao tratamento dopaminérgico e pode preceder os sintomas clássicos do parkinsonismo (DJALDETTI et al., 2004). Apesar da dor neuropática central na DP ter sido apontada já em 1921 por Souques como dor parkinsoniana primária, esse sintoma ainda tem sido pouco estudado (TRUINI et al., 2013). A maioria dos pesquisadores acredita que esse tipo de dor surge diretamente da

disfunção dos NB, que altera o processamento sensorial de estímulos nociceptivos (BEISKE, 2009; WASNER, DEUSCHL, 2012).

Tabela 2 – Classificação da dor, adaptada de Bonnet et al., 2012.

Tipo de dor	Descrição	Características
Dor musculoesqueletal	Câimbras, artralgia e mialgia	Podem exacerbar-se pela rigidez parkinsoniana, imobilidade e alterações posturais; São aliviadas pelo movimento; Podem estar associadas a doenças reumatológicas e ortopédicas; Podem flutuar com a dose da medicação e melhorar com o uso da levodopa.
Dor distônica	Associada a movimentos descontrolados e repetitivos e contrações musculares frequentemente muito fortes e dolorosas.	Pode flutuar em estreita colaboração com a administração de medicamentos: distonia da fase "*off*", distonia de manhã, distonia dose-pico, distonia bifásica.
Dor radicular / neuropática	Dor em um território de raiz ou nervo.	Associada a sinais motores ou sensoriais de pinçamento do nervo ou raiz.
Dor central ou primária	Queimação, formigamento, sensação "neuropática", frequentemente implacável e de qualidade bizarra, não confinada ao nervo.	Pode ter caráter autonômico, com sensações viscerais ou dispneia; Pode variar em paralelo com o ciclo da medicação; Não explicada pela rigidez, distonia, alterações musculoesqueletais ou lesões internas.
Acatisia	Sensação subjetiva de inquietude, muitas vezes acompanhada por necessidade de movimentação.	Pode flutuar com efeito de medicação, e melhorar com o uso da levodopa.
Outros tipos de dor	Dor genital e oral	Ardência bucal ou síndrome da vagina; Pode representar um sinal sensorial da fase "off" e melhorar com L-dopa.

Vários modelos animais demonstraram efeitos diversos no comportamento da dor após a microinjecção de opiáceos, DA e ácido gama-aminobutírico (GABA) nos NB, confirmando, assim, a existência de uma base neurológica para a dor na DP (CHUDLER;

DONG, 1995). A base neural por trás da disfunção na percepção da dor na DP ainda não é bem estabelecida, contudo, evidências experimentais vêm demonstrando repetidamente que o circuito dos NB e, particularmente, o sistema nigroestriatal exercem um papel substancial no processamento da informação somatossensorial nociva (CHUDLER; DONG, 1995).

Na última década tem-se enfatizado a necessidade e a importância de novos estudos sobre a prevalência de dor e de outros SNM na DP (CHAUDHURI et al., 2006).

2.2.1. Nocicepção e os Núcleos da Base

Assim como os SM, há a hipótese de que os SNM, incluindo a dor, surgem através de mecanismos que envolvem os NB (CHUDLER, DONG, 1995; SCHAPIRA, 2011). Estudos neurofisiológicos e clínicos, além de experimentos comportamentais, indicam que os NB processam informações somatossensoriais nocivas e não nocivas (CHUDLER; DONG, 1995).

As informações somatossensoriais que chegam aos NB podem ser usadas para selecionar ou modificar movimentos em resposta a demandas ambientais específicas. Desta forma, a codificação da intensidade dos estímulos nocivos pelos neurônios dos NB pode estar associada, através de uma integração sensório-motora, à seleção de respostas motoras específicas para escapar da fonte de dor ou para evitar mais dor ou dano ao organismo (CHUDLER; DONG, 1995).

Evidências neuroanatômicas sugerem que a informação nociceptiva pode alcançar os NB a partir de várias regiões como o córtex cerebral, o tálamo medial e posterior, a amígdala, a área parabraquial e o núcleo dorsal da rafe (NDR). Da mesma forma, muitas das vias eferentes que deixam os NB projetam-se de volta para essas áreas, formando uma espécie de alça. Nesse sentido, esses circuitos neuronais formam um mecanismo regulador de *feedback* sobre o processamento da informação nociceptiva, que é utilizado para ajustar os movimentos em resposta aos estímulos nociceptivos (CHUDLER; DONG, 1995).

Estudos apontam que a via tecto-tálamo-estriatal está envolvida com a retirada, orientação e prevenção do estímulo nocivo (CHUDLER et al., 1993; REDGRAVE et al., 1996) e com ajustes posturais na resposta a estímulos ambientais importantes (GRUNWERG; KRAUTHAMER, 1992).

Existe uma hipótese de que a dopamina, o GABA e os opióides dentro dos NB atuam como inibidores tônicos da atividade nociceptiva do tálamo medial. Desta forma, manipulações farmacológicas que aumentam a atividade desses neurotransmissores, poderiam exercer efeito analgésico. Por outro lado, danos nos NB podem eliminar essa influência

inibitória na atividade nociceptiva, o que pode resultar em desinibição da entrada da informação nociceptiva ascendente, aumentando a dor (CHUDLER; DONG, 1995).

Pacientes com distúrbios nos NB (como DP ou doença de Huntington) têm alterações na sensação de dor em associação a anormalidades motoras. Frequentemente, esses pacientes apresentam dores intermitentes que envolvem grandes áreas corporais e, portanto, são difíceis de localizar. (CHUDLER; DONG, 1995). De fato, os neurônios nociceptivos dos NB possuem campos receptivos bilaterais amplos com forte resposta à intensidade do estímulo, sugerindo, assim, que mais do que a localização espacial do estímulo, o estriado codifica a intensidade da informação nociceptiva (RICHARDS; TAYLOR, 1982). Experimentos em animais demonstraram a falta de participação dos NB na localização espacial da dor. Isso pode explicar essa dificuldade de localização da dor nos pacientes com Parkinson (CHUDLER; DONG, 1995).

Vários estudos sugerem que, na DP, a função anormal dos NB influencia diretamente a modulação da dor, aumentando ou diminuindo a propagação do sinal nociceptivo e, indiretamente, afetando processos afetivos e cognitivos, determinando assim, como os pacientes experimentam e interpretam os sinais nociceptivos e a dor (TURINI et al., 2013).

2.2.2. Nocicepção e as Monoaminas

Embora neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, acetilcolina e serotonina estejam envolvidos nos sintomas de dor e nas mudanças da sensibilidade dolorosa observadas nos pacientes com DP, são poucos os experimentos que avaliaram a correlação da dor com os níveis de neurotransmissores em pacientes com a doença (CHUDLER; DONG, 1995).

Mecanismos noradrenérgicos e serotoninérgicos de mediação da inibição descendente foram descritos extensivamente (MILLAN, 2002). O LC noradrenérgico é ativado por estímulos nocivos e essa ativação leva a uma inibição da dor percebida, sendo que o estímulo nociceptivo leva a um aumento da liberação de noradrenalina por esse núcleo (SZABADI, 2012).

Pacientes com Parkinson e sintomas dolorosos têm menor tolerância à dor e menores níveis do metabólito monoaminérgico ácido 5-hidroxindolacético ou 5-HIAA (um metabólito da serotonina) no líquido cefalorraquidiano, quando comparados a pacientes com Parkinson sem sintomas de dor (URAKAMI et al., 1990). Vários estudos reportam que o NDR, cujo neurotransmissor mais abundante é a serotonina, tem importante participação na função

antinociceptiva (QING-PING; NAKAI, 1994). Oliveras et al. (1979) relataram que o NDR é o núcleo mais eficaz na resposta analgésica secundária à estimulação *in loco*.

Estudos já realizados apontaram que o sistema dopaminérgico não está envolvido apenas no controle motor, mas também na modulação e processamento da informação somatossensorial, incluindo a dor (CHUDLER; DONG, 1995; MAGNUSSON; FISHER, 2000). Neurônios dopaminérgicos mesencefálicos recebem aferências nociceptivas de curta latência dos núcleos parabraquiais (COIZET et al., 2010). A DA pode modular a dor em vários níveis do sistema nervoso, incluindo a ME, o tálamo, a PAG, os NB e o córtex cingulado (CHUDLER; DONG, 1995; SHYU, et al., 1992). Ratos com lesões dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais demonstraram hipersensibilidade a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (CHUDLER; LU, 2008; SAADÉ et al., 1997). Em seu recente estudo, Ogata et al. (2015) demonstraram que o sistema dopaminérgico tem papel crucial no desenvolvimento de uma rede neural para a dor, incluindo o circuito da medula espinhal, e que o mecanismo subjacente à hiperalgesia evocada pela depleção de DA, nem sempre é consistente com as alterações motoras.

2.3. Parkinson e Audição

O sistema auditivo é constituído por estruturas sensoriais e conexões centrais responsáveis pela audição. Esse sistema pode ser dividido em duas porções distintas e inter-relacionadas, definidas como sistema auditivo periférico e sistema auditivo central, sendo a porção periférica compreendida por estruturas da orelha externa, da orelha média, da orelha interna e do sistema nervoso periférico (nervo vestibulococlear) e a porção central representada pelas vias auditivas localizadas no tronco encefálico e em áreas corticais (BONALDI, 2011).

A função do sistema auditivo periférico é a captação e a transmissão da onda sonora e a função do sistema auditivo central é o processamento, a interpretação e a integração da informação auditiva (KANDEL et al., 2003).

A via auditiva é dividida em primária e secundária. A via auditiva primária é curta, rápida e termina no córtex auditivo primário, localizado no lobo temporal. Esta via veicula a informação codificada pela cóclea às regiões de decodificação e de interpretação dos sons que, em sequência, retransmite a informação para regiões corticais superiores. A via auditiva secundária localiza-se no sulco lateral e no giro temporal superior (área 22 de Broadman) e atua integrando e interpretando os sons (KANDEL et al., 2003).

Estudos prévios demonstram a existência de um sistema eferente auditivo que pode ser encontrado em todas as classes de vertebrados e em alguns invertebrados. Em humanos, esse sistema emerge do córtex cerebral e vai até a cóclea, sendo que no nível do TE, as fibras partem preferencialmente do complexo olivar superior (COS) e seguem em direção à orelha interna (BREUEL et al., 2001; SAHLEY et al., 1997). O COS é um núcleo pontino que está implicado na análise complexa e na filtragem da informação auditiva que ascende até ao córtex cerebral e, também, na proteção do sistema auditivo (MAISON et. al., 2012).

Todas as fibras eferentes originadas dos mais diversos pontos do SNC organizam-se ao nível do COS. Em seguida, descem em direção à cóclea através de dois tratos distintos, o trato olivococlear medial (TOM), que tem como destino final as células ciliadas externas (CCE) da cóclea e o trato olivococlear lateral (TOL), responsável pela inervação das células ciliadas internas (CCI) da cóclea (BREUEL et al., 2001).

Estudos farmacológicos sugerem que um dos muitos neurotransmissores expressos no TOL é a DA que, liberada nos terminais ao nível das CCI, atua suprimindo a atividade auditiva espontânea e evocada nas fibras do nervo coclear, contribuindo assim, para o controle da excitotoxicidade induzida pelo ruído ambiental (MAISON et. al., 2012).

A perda auditiva e a DP são desordens prevalentes na terceira idade e ambas as condições envolvem o SNC. Se a perda auditiva for uma manifestação precoce da DP, intervenções podem ser realizadas precocemente (LAI et al., 2014). Alguns estudos já procuraram investigar as possíveis alterações na função auditiva periférica e central em decorrência da DP.

Pekkonen et al. (1994) observaram que os pacientes com DP apresentaram alterações na discriminação auditiva automática, provavelmente relacionadas à deficiência de DA. Matsui et al. (2007) concluíram que os pacientes com Parkinson apresentam déficits na atenção auditiva. Outras evidências apontam que, somado ao comprometimento cognitivo na DP e independente dele, os pacientes são afetados por déficits de percepção do domínio temporal da informação auditiva (GUEHL et al., 2008). Em outro estudo, Zeigelboim et al. (2011) apontaram que há dificuldade na identificação de um som na coexistência de outro competitivo e na habilidade de memória em pacientes com DP. Yýlmaz et al. (2009) demonstraram que os limiares auditivos tonais e os potenciais evocados auditivos podem estar afetados na DP. Em seu estudo publicado recentemente, Lai et al. (2014) avaliaram a incidência da DP em pacientes idosos diagnosticados com perda auditiva em comparação com pacientes idosos sem perda auditiva. Eles observaram que a incidência da DP foi significativamente maior nos idosos com perda auditiva (3,11/1.000 pessoas) do que nos

idosos sem perda auditiva (1,77/1.000 pessoas). Vitale et al. (2012) verificaram que a perda auditiva em altas frequências é relativamente mais evidente em pacientes com DP.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a função auditiva periférica em modelos experimentais de Parkinson e ainda existem poucos estudos explorando a função auditiva em pacientes com DP, tanto por meio da audiometria tonal, quanto por meio dos potenciais evocados auditivos (LAI et al., 2014).

2.4. Modelo Animal da DP Induzido por Reserpina (RES)

Modelos animais da DP podem ser divididos em várias categorias, dentre elas, modelos que buscam reproduzir algumas das anormalidades genéticas que podem levar ao parkinsonismo (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DAWSON, et al., 2010), modelos que tentam replicar a propagação da patologia (como através da infusão intraparenquimal de oligômeros de alfa-sinucleína) (KALIA et al., 2013), modelos que usam componentes farmacológicos para depleção aguda de DA ou para antagonizar a transmissão dopaminérgica (BEZARD; PRZEDBORSKI, 2011), e modelos que utilizam neurotoxinas para danificar neurônios dopaminérgicos, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e o MPTP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Muitos dos avanços no conhecimento sobre as características fisiopatológicas e os princípios de tratamento envolvidos na DP são provenientes de estudos que utilizaram alguns desses modelos. Seu uso viabiliza o entendimento dos mecanismos envolvidos na DP e permite a exploração de novos tratamentos, sendo muito importante para o desenvolvimento de novos fármacos antiparkinsonianos (MEREDITH et al., 2008) e de estratégias terapêuticas neuroprotetoras (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

O modelo da RES foi um dos primeiros modelos animais empregados na pesquisa da DP. Foi proposto em 1957 por Carlsson et al. para induzir sintomas motores semelhantes aos da DP em animais de laboratório, visando estudar mais detalhadamente aspectos biológicos envolvidos com esses sinais motores (SANTOS, 2012). A RES é um alcaloide extraído da *Rauwolfia Serpentina* que causa a depleção dos estoques de monoaminas, através do bloqueio da incorporação das aminas para os locais de armazenamento nos grânulos intracelulares (ou vesículas sinápticas) (CARLSSON et al., 1975).

A RES inibe o transportador de monoaminas vesicular (do inglês, *vesicular monoamine transporter* [VMAT]) durante a transmissão neuronal. O VMAT é uma proteína de transporte integrada à membrana de vesículas sinápticas dos neurônios pré-sinápticos que

atua no transporte de monoaminas, tais como a dopamina, a serotonina e a noradrenalina, para as vesículas, as quais liberam esses transmissores nas fendas sinápticas. Ao inibir o VMAT, a RES bloqueia o armazenamento das monoaminas nas vesículas, o que leva ao catabolismo oxidativo desses transmissores, incluindo a DA, nos terminais nervosos pela monoamina oxidase (MAO) e, consequentemente, resultando em estresse oxidativo celular (LOHR et al., 2003).

Além disso, a RES aumenta também o estresse oxidativo, ao favorecer um aumento da atividade da catalase e da peroxidação lípidica (ABÍLIO et al., 2004) e uma redução dos níveis de glutationa no estriado (ABÍLIO et al., 2003).

Deve-se ressaltar que a RES não atua seletivamente na depleção de DA, principal neurotransmissor envolvido com a fisiopatologia da DP (GALEA et al., 2012; HORNYKIEWICZ, 1998), mas também, na depleção das outras monoaminas como a noradrenalina e a serotonina. Todavia, é bem estabelecida a participação de outras monoaminas no desenvolvimento da DP (CASH, et al., 1984; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; HUOT et al., 2011; McDONALD et al., 2003; TEIVE, 2005), o que justifica o uso da RES como um bom modelo para o estudo de diversos processos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais envolvidos no desenvolvimento dessa doença.

O modelo da DP induzido por RES é um dos mais utilizados em estudos pré-clínicos que visam à descoberta de novas drogas para o tratamento da DP (DUTY; JENNER, 2011). Esse é considerado um bom modelo preditivo para a investigação de novos fármacos antiparkinsonianos, uma vez que drogas dopaminérgicas e não dopaminérgicas utilizadas no tratamento da DP são capazes de reverter as alterações locomotoras induzidas por RES em roedores (DUTY; JENNER, 2011). Os estudos da DP através do modelo da RES colaboraram para a fundamentação da utilização da L-dopa em pacientes com DP (CARLSSON et al., 1957). Além disso, graças a esse modelo, muitos pesquisadores foram capazes de demonstrar que os comportamentos motores anormais que se manifestam nos mamíferos, ocorrem quando os níveis de DA no estriado já sofreram redução para níveis 60 a 70% abaixo do normal e que a supersensibilidade dos receptores aos agonistas dopaminérgicos surge em resposta a um esgotamento maior que 80% de DA no estriado (DUTY; JENNER, 2011).

Embora haja um grande número de modelos animais no estudo da DP, os modelos desenvolvidos, em sua maioria, não caracterizam a natureza progressiva dessa patologia, em que a morte dos neurônios dopaminérgicos ocorre de forma gradual. Muitos deles baseiam-se em aplicações agudas de drogas indutoras de sintomas parkinsonianos em doses capazes de provocar em pouco tempo alterações motoras intensas (DUTY; JENNER, 2011). A

administração única de RES em doses que variam de 1 a 10 mg/Kg induz alterações motoras como hipocinesia, rigidez muscular e tremor (GERLACH; RIEDERER, 1996) e alterações cognitivas e de memória (CARVALHO et al., 2006; FERNANDES et al., 2008) que podem ser muito intensas e em um curto período de tempo, o que não caracteriza a natureza progressiva da DP conforme ela ocorre nos seres humanos. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a RES administrada em ratos nas doses de 0,1 a 0,5 mg/kg provoca alterações de memória e ansiedade, embora ainda não provoque alterações motoras (FERNANDES et al., 2008; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2002). Dessa forma, o tratamento repetido com baixas doses de RES mostrou-se eficaz em reproduzir a natureza progressiva da DP conforme acontece nos seres humanos. Nesses estudos, os animais apresentaram, progressivamente, alterações motoras (evidenciadas no teste do campo aberto, no teste de catalepsia e na avaliação dos movimentos orais), que foram precedidas de alterações não motoras como déficits de cognição e de memória (observadas no teste de reconhecimento de objeto novo) e todas essas alterações comportamentais tiveram relação com as alterações neuroquímicas encontradas nos cérebros dos animais (SANTOS et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade motora, a nocicepção e a audição em ratos da linhagem Wistar submetidos ao modelo progressivo de parkinsonismo induzido por baixas doses de reserpina (RES).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade motora dos animais ao longo do tratamento com doses baixas e repetidas de RES;
- Verificar a função nociceptiva dos animais ao longo do tratamento com doses baixas e repetidas de RES;
- Avaliar a função coclear dos animais tratados com doses baixas e repetidas de RES;
- Verificar o número de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH), em diferentes áreas cerebrais dos ratos, após a administração repetida de baixas doses de RES;
- Investigar a expressão de c-FOS em áreas envolvidas com a nocicepção após a administração repetida de baixas doses de RES.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (350 a 500 gramas), com 5 a 6 meses, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h, sob ventilação e temperatura controladas (22±2ºC), com livre acesso à água e comida. Os animais permaneceram no biotério de origem, em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm), com o número máximo de cinco animais em cada uma. Para utilização dos animais, foram respeitados os princípios éticos estabelecidos pelas Resoluções Normativas, Decretos e Portarias do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), bem como a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS, protocolo nº 36/2014) e todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento e o número de animais usados.

4.2. Drogas

- Ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR), 99,7%;
- Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União), 100 mg/mL;
- Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União), 20 mg/mL;
- Reserpina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) dissolvida em solução de ácido acético 0,1% na concentração de 0,1 mg/mL;
- Solução salina (NaCl 0,9%);
- Formalina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) Solução a 37% de formaldeído.

4.3. Procedimentos Gerais

Todos os testes foram realizados entre as 8 e 13h e as injeções aplicadas a cada 48h, sempre após os testes. Os aparatos utilizados nos testes foram limpos com uma solução de etanol a 10% entre a entrada de um animal e outro, evitando ou minimizando possíveis pistas de odor deixadas por outro animal.

Os animais envolvidos na pesquisa foram manipulados pelos experimentadores diariamente por 5 minutos durante 5 dias antes do início dos procedimentos experimentais visando habituá-los ao experimentador, evitando possíveis estresses de manipulação durante os testes comportamentais.

O pesquisador que realizou os testes comportamentais e as contagens de células não teve conhecimento do tratamento que cada animal recebeu.

4.4. Modelo Progressivo de DP Induzido pela Administração Repetida de Baixas Doses de Reserpina (RES)

A reserpina (5 μg) foi dissolvida em uma gota de ácido acético glacial (0,1%) e, posteriormente, diluída para a concentração correta em água destilada. A solução controle foi a mesma do veículo da RES. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1-veículo (CTR), 2-RES. Após esta etapa, os animais receberam as injeções por via subcutânea (s.c.) de veículo ou de RES (0,1 mg/kg) a um volume de 1 mL/kg de peso corporal, administradas a cada 48h, durante todo o período experimental.

4.5. Testes

4.5.1. Teste de Catalepsia

A catalepsia é definida como um estado comportamental caracterizado por inibição motora e rigidez muscular que pode ser induzido experimentalmente pela depleção de dopamina (DA) provocada pela administração da RES (GERLACH; RIEDERER, 1996). O comportamento de catalepsia foi avaliado colocando-se o animal com ambas as patas dianteiras sobre uma barra horizontal de vidro elevada a 9,0 cm da superfície de apoio das patas traseiras, como representado na figura 3. O tempo de permanência nesta posição foi considerado como medida de catalepsia e foi mensurada a latência para o animal realizar um movimento, ou seja, sair da posição inicial. Os animais foram submetidos três vezes consecutivas ao aparato e as latências foram medidas até o limite de 180 segundos. Para cada dia foi registrada a média do tempo das três tentativas (SANTOS, 2012).

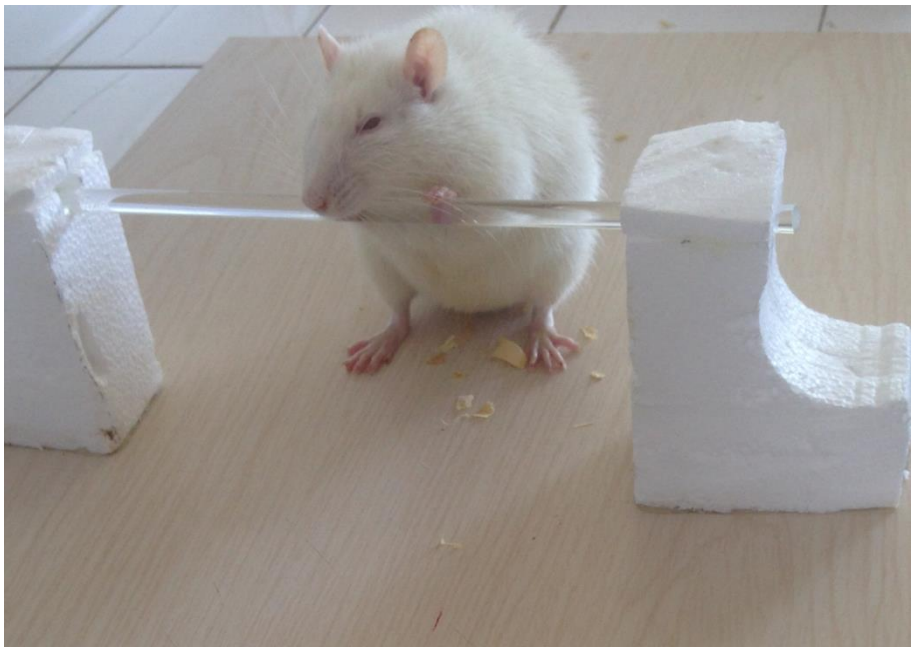

Figura 3: Rato Wistar na barra de catalepsia.

4.5.2. Teste de Força de Preensão *(Grip Strength* T*est)*

A força muscular dos animais foi medida através do teste de força de preensão, que é uma técnica utilizada para medir a força dos membros anteriores e a aderência dos membros posteriores de ratos e camundongos. O procedimento é um teste da função motora que tem grande potencial em estudos relativos aos efeitos neuromotores de agentes ambientais e farmacológicos, utilizando equipamentos de baixo custo, além de rápido e eficiente (DUNNET et al., 1998; MEYER et al., 1978). O aparato utilizado (EFF-305, *Insight*, Ribeirão Preto, SP) consiste em um dispositivo ou plataforma, no qual o animal tende a se agarrar. Esse dispositivo é conectado a um medidor de tensão ou célula de carga. Os animais foram colocados sobre a plataforma para se agarrarem nela. Em seguida, foram puxados pela cauda até que se soltassem do dispositivo, e foram registradas, em gramas (g), as leituras do medidor de tensão. Os animais foram submetidos três vezes ao aparato e para cada dia de teste foi registrada a média da força durante as três tentativas (Figura 4).

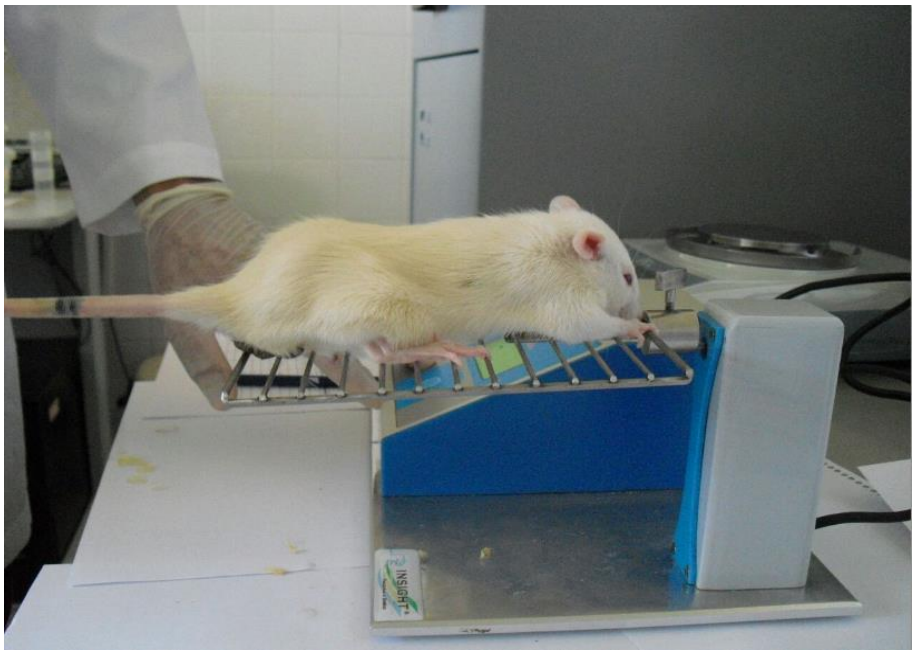

Figura 4: Rato Wistar no teste de força de preensão.

4.5.3. Teste von Frey Eletrônico

Os limiares nociceptivos para estímulo mecânico foram avaliados através do teste do von Frey eletrônico. Para tanto, os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha de 5 mm² de arame não maleável de 1 mm de espessura (EFF 303, *Insight*, Ribeirão Preto, SP), mostrado na figura 5, durante 15-30 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Foram posicionados espelhos 25 cm abaixo das caixas de experimento para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador aplicou uma pressão linearmente crescente com um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas, por meio de uma ponteira de propileno com 0,5 mm de diâmetro. A pressão foi aplicada no centro de cada pata traseira até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como uma sacudida (*"flinch"*) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos em triplicata. O limiar de retirada da pata foi quantificado em gramas (g) através da média dos três valores obtidos, tanto para a pata direita, quanto para a esquerda (Figura 5).

Figura 5: Rato Wistar no teste do von Frey eletrônico.

4.5.4. Teste da Formalina

O teste da formalina é um método muito utilizado para estudo dos mecanismos de nocicepção prolongada. É um teste que se diferencia dos demais testes de dor, porque possibilita verificar a resposta do animal a uma dor contínua e moderada gerada por uma lesão química tecidual. Dessa forma, acredita-se que esse teste produza um modelo mais válido de dor clínica do que os testes de mecanismo fásico ou de estímulo térmico (DUBUISSON; DENNIS, 1977). O procedimento do teste consiste na injeção de formalina na planta da pata do rato, de modo a produzir uma lesão tecidual que resulta em duas fases de comportamento defensivo, caracterizadas pela lambida ou sacudida da pata, que são separadas por um pequeno período de quiescência (ZHANG, 2011). O teste constitui um modelo de dor inflamatória tônica, em que a primeira fase decorre da ativação direta das fibras aferentes primárias e a segunda é considerada um reflexo de um período durante o qual ocorrem fenômenos inflamatórios (LE BARS, et al., 2001; TASSORELI et al., 2007). No presente estudo, o tempo de observação comportamental adotado foi 0 a 5 minutos para a fase 1 e 15 a 30 minutos para a fase 2.

A nocicepção foi induzida através da administração subcutânea de 50 µL de solução de formalina a 1% na região plantar da pata direita. Antes da administração, os animais foram colocados em uma caixa de observação transparente (25 x 15 x 15 cm) durante 10 minutos para reconhecimento e adaptação ao local. Posteriormente, foram removidos para a

administração da formalina e recolocados na caixa de observação. Um espelho foi colocado atrás da câmara para facilitar a observação dos comportamentos dos animais. Os ratos foram observados logo após a administração da formalina durante cinco minutos (fase 1). Em seguida, houve uma interrupção da observação por dez minutos e, posteriormente, mais quinze minutos de observação (fase 2). Os parâmetros comportamentais avaliados foram a latência para início da lambida da pata na fase 1 e o tempo de lambida e quantidade de sacudidas da pata nas fases 1 e 2. Foram excluídos da análise os animais que porventura tiveram a formalina extravasada da pata (figura 7).

Figura 6: Resposta nociceptiva de lambida da pata no teste da formalina.

4.5.5. Teste de Otoemissões Acústicas por Produto de Distorção (OEAPD)

As otoemissões acústicas (OEA) consistem no registro da energia sonora gerada pelas células ciliadas externas (CCE) da cóclea (orelha interna), captada por um microfone miniaturizado, em resposta a sons aplicados por uma sonda no conduto auditivo externo do animal. As otoemissões acústicas por produto de distorção (OEAPD) ocorrem após a estimulação por dois tons puros chamados f1 e f2 e a resposta captada é produto da intermodulação ou o produto de distorção produzido pela orelha estimulada (DURANTE, 2011). As EOA constituem um índice muito sensível da integridade do mecanismo auditivo, uma vez que a resposta desaparece quando existir qualquer anomalia funcional na orelha interna. Trata-se de um método de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade e que

vem sendo utilizado, há alguns anos, para avaliar a função auditiva em modelos experimentais.

Os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitonial, e colocados dentro de uma caixa acústica. As OEAPD foram registradas através do equipamento modelo Otoport (*Otodinamics*, Herts, UK). Para realização do teste, utilizou-se a relação de duas frequências apresentadas: 2f1–f2, sendo f(2)/f(1) = 1,22 e a intensidade apresentada foi de 70 dB NPS para ambas as frequências. Os resultados foram as amplitudes da relação sinal/ruído em decibel (dB) para cada frequência avaliada, as quais foram comparadas tanto com os valores normativos encontrados na literatura quanto com as respostas dos animais do grupo CTR. Foram consideradas as OEA de 2.000 a 8.000 Hz e foram incluídos na análise somente os animais que tiveram OEA (otoemissões acústicas) presentes (Figura 6).

Figura 7: Rato Wistar, sedado, no teste de otoemissões acústicas por produtos de distorção.

4.6. Delineamento Experimental

O estudo foi dividido em dois experimentos. Em ambos os experimentos, os animais foram pesados a cada quatro dias (ou duas injeções) para ajustar as doses de anestésico, tratamento ou veículo. No experimento 1, foram avaliadas as funções motora e nociceptiva, bem como o momento em que elas ocorreram ao longo do tratamento. O segundo consistiu do monitoramento da função motora através do teste de catalepsia e, adicionalmente, foram

avaliadas as funções auditiva e nociceptiva, esta última para um estímulo nocivo diferente do utilizado no experimento 1. Ao final do período experimental, os animais foram perfundidos e seus cérebros foram extraídos para posterior análise imunohistoquímica.

4.6.1. Experimento 1

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo 1 (CTR, n=9) e grupo 2 (RES, n=10). No dia 0, os animais foram submetidos às avaliações basais de: (1) Teste de catalepsia e (2) Teste do von Frey eletrônico. Após os testes, receberam a primeira injeção de RES (0,1 mg/kg, s.c.) ou veículo. Os animais foram submetidos aos testes de catalepsia e von Frey diariamente. O teste de força de preensão (*grip strenght test*) foi realizado nos dias 9 (24h após a 5ª injeção), 12 (48h após a 6ª injeção), 14 (48h após a 7ª injeção) e 17 (24h após a 9ª injeção). No dia 20 foram anestesiados, perfundidos e seus cérebros foram retirados para posterior análise imunohistoquímica (Figura 8).

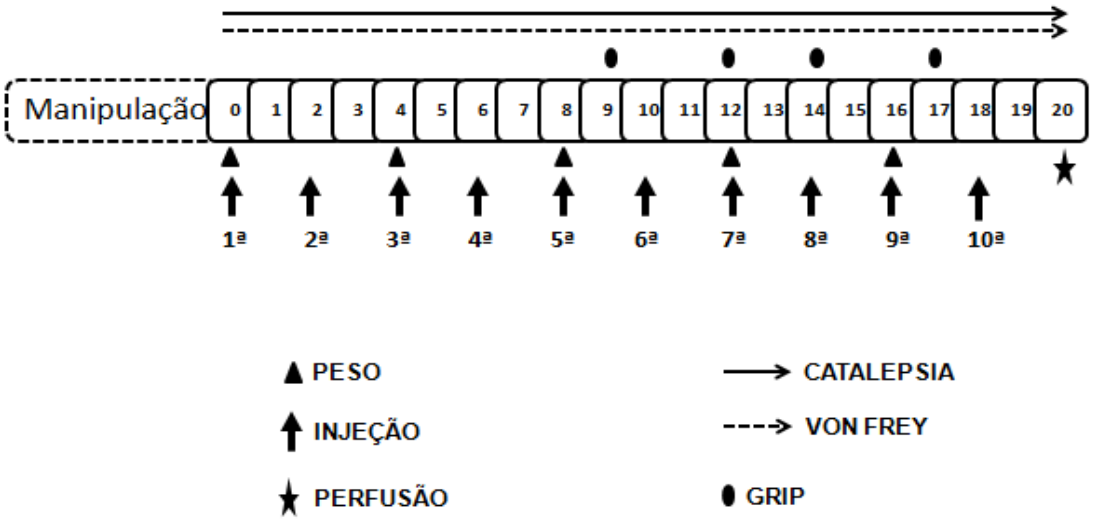

Figura 8: Representação esquemática do experimento 1.

4.6.2. Experimento 2

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo 1 (CTR, n=10) e grupo 2 (RES, n=11). No dia 0, todos os animais foram submetidos à avaliação basal do teste de catalepsia e, em seguida, receberam a primeira injeção de RES ou veículo. Seguindo o mesmo protocolo do experimento 1, o teste de catalepsia foi realizado diariamente e as injeções foram feitas a

cada 48h. No dia 8 (48h após a 4ª injeção), os animais foram sedados para realização do teste de OEAPD.

No dia 10, os animais foram submetidos ao teste da formalina e foram anestesiados 60 minutos depois, para perfusão e retirada dos cérebros para análise imunohistoquímica (Figura 9).

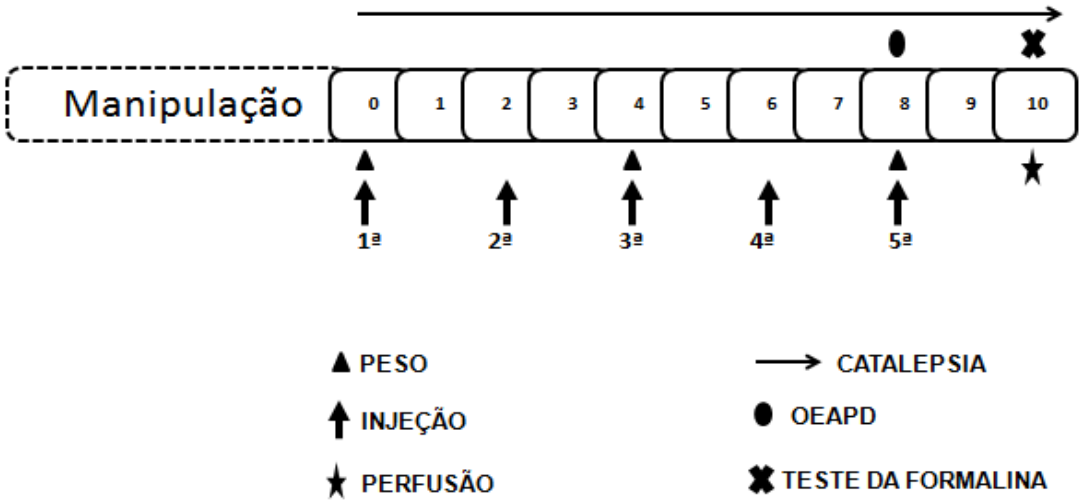

Figura 9: Representação esquemática do experimento 2. OEAPD = Otoemissões acústicas por produto de distorção.

4.8. Perfusão dos Animais

Findos os experimentos, os animais foram perfundidos de forma intracardíaca com tampão fosfato salina (PBS; pH 7,2-7,4; 0,1M) por 5 minutos para a lavagem dos vasos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PB; pH 7,4; 0,1M) por 10 minutos para fixação dos tecidos. Os cérebros foram removidos e mergulhados em PFA a 4%, a 4ºC, onde permaneceram por 24h.

Concluída a perfusão, as carcaças dos animais 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 biológico. Os resíduos perfuro-cortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o Hospital Universitário para o descarte hospitalar.

Os cérebros foram crioprotegidos por 48h em sacarose a 30% na temperatura de 4ºC. Posteriormente, foram congelados a -70 ºC e levados a um criostato a -20 ºC para obtenção de secções frontais de 50 µm, que foram distribuídas sequencialmente em 5 compartimentos, em meio líquido contendo PB 0,1M, pH 7,4. Cada um desses compartimentos correspondeu a 1

de 5 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte foi de, aproximadamente, 250 µm. Esses cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e PB, e posteriormente conservados a -20ºC até a análise imunohistoquímica.

4.9. Análise Imunohistoquímica para TH e c-FOS

A análise imunohistoquímica foi realizada para a enzima tirosina hidroxilase (TH) e para o prooncogene c-FOS. A tirosina hidroxilase (TH) é a enzima inicial e limitante da síntese das catecolaminas. A imunorreação com o anticorpo para TH indica os locais de síntese das catecolaminas e não mostra diretamente o produto final.

A proteína FOS é um marcador de ativação neuronal. Assim, um estímulo doloroso pode causar a rápida ativação do prooncogene c-FOS, o qual promove a expressão da proteína FOS dentro de núcleos específicos relacionados com a integração da percepção da dor no SNC. O mapeamento e a quantificação da expressão de FOS em resposta a um estímulo nocivo padronizado é uma possível medida funcional da ativação de áreas nociceptivas relacionadas com as respostas comportamentais (TASSORELI et al., 2007).

Para a realização dos procedimentos da imunohistoquimica, processada em temperatura ambiente (22ºC), as secções cerebrais foram lavadas quatro vezes por cinco minutos sob agitação automática em solução de PB 0,1M. As secções de um compartimento de cada animal foram pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,03% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. Em seguida, foram feitas mais quatro lavagens em PB, sob agitação automática. Cada animal teve os cortes de uma secção colocados em contato com os anticorpos primários policlonais anti-TH (1:5000) ou anti-c-FOS (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) produzidos em coelho e diluídos em PB contendo Triton-X 100 (ICN Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, U.S.A) a 0,4% e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, U.S.A) a 2% durante 18 horas (22ºC). Em seguida, as secções foram lavadas 4 vezes em PB e colocadas em contato com o anticorpo secundário biotinilado (cabra anti-coelho), na concentração de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, U.S.A), diluído em Triton-X 100 a 0,4%, por 2 horas. Após esta etapa, os tecidos foram novamente lavados 4 vezes com PB e incubados numa solução contendo complexo avidina biotina (ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, U.S.A) mais Triton-X 100 NaCl, por 2 horas. Após serem lavados mais 4 vezes em PB, os cortes foram colocados em contato com um cromógeno, a

diaminobenzidina-DAB (Sigma, St Louis, MO, U.S.A) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4) e 0,01% de H_2O_2 para visualização da reação.

As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas e, em seguida, foram desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de etanol, clareadas com xilol e as lamínulas fixadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). As secções foram examinadas por iluminação de campo claro ou escuro, a depender da necessidade (Olympus Microscope, BX-41, Melville, NY, U.S.A) e as imagens foram capturadas com uma câmera digital (Nikon, DXM-1200, Melville, NY, U.S.A) acoplada ao microscópio. Para a avaliação da densitometria óptica relativa, todas as imagens foram obtidas sem mudança na iluminação do microscópio e não foram realizados ajustes de brilho e contraste das fotos submetidas a esta análise. As áreas analisadas para a TH foram a substância negra parte compacta (SNpc), a área tegmental ventral (VTA) e o estriado dorsal (SANTOS et al., 2013) e para a quantificação de c-FOS a porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *ventrolateral periqueductal gray* - vlPAG) o bulbo rostral ventromedial (RVM) e o núcleo dorsal da rafe (NDR) (NASCIMENTO et al., 2014). A localização das áreas foi determinada através do atlas Paxinos e Watson (2007).

4.10. Contagem de Células

Imagens dos cortes de cada animal foram feitas em aumento de 4x, para observação em detalhes da presença ou ausência de células imunorreativas. A contagem de células foi realizada em 6 secções de cada animal e o número de células para cada um deles correspondeu à média entre as 6 secções analisadas. As áreas analisadas foram: SNpc e VTA para células TH+ e vlPAG, RVM e NDR para células c-FOS+. Todas as células TH+ e c-FOS+ das áreas de interesse foram contadas usando o programa Image J (versão 1.46i, NIH) e a delimitação das áreas foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). Todas as contagens foram realizadas de forma mascarada, em que o experimentador não sabia a que grupo pertencia cada imagem. Os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

4.11. Densidade Óptica Relativa – DOR

Para a análise da DOR, as imagens foram obtidas no 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 6 imagens consecutivas. Usando o programa Image J (versão 1.46i, NIH) foi selecionado todo o estriado dorsal. Na mesma imagem, também foi selecionado um campo no corpo caloso, considerado como área controle. O número médio de pixels calculados no estriado foi subtraído do número médio de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

4.12. Análise Estatística

Antes das análises estatísticas, todos os dados foram analisados quanto a sua normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os comportamentos de catalepsia, força de preensão (*grip*) e nocicepção para estímulo mecânico (von Frey) foram analisados ao longo do tratamento através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo pós teste de Bonferroni ou múltiplas comparações com o teste-t de *Student*, a fim de determinar o valor de p para a diferença entre os grupos, dia a dia. Para a função auditiva (OEAPD), a nocicepção por estímulo químico (teste da formalina), a contagem de células e a DOR, utilizamos o teste-t de *Student*. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para realização das análises foi utilizado o software *Graphpad Prism* 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1

5.1.1. Comportamento de Catalepsia

No teste de catalepsia, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias do tratamento) [F(20,340) = 17,41, p < 0.0001], do tratamento (CTR, RES) [F(1,17) = 48,74, p < 0,0001] e da interação tempo x tratamento [F(20,340) = 13,56, p < 0,0001]. O tratamento com a RES causou um aumento progressivo no comportamento de catalepsia, com diferença significativa em relação ao grupo CTR a partir do 16º dia (48h após a 8ª injeção), que permaneceu até o 20º dia: [t(17) = 5,223; 3,901; 4,674; 4,699; 3,892], respectivamente, para os dias 16 a 20 (Figura 10).

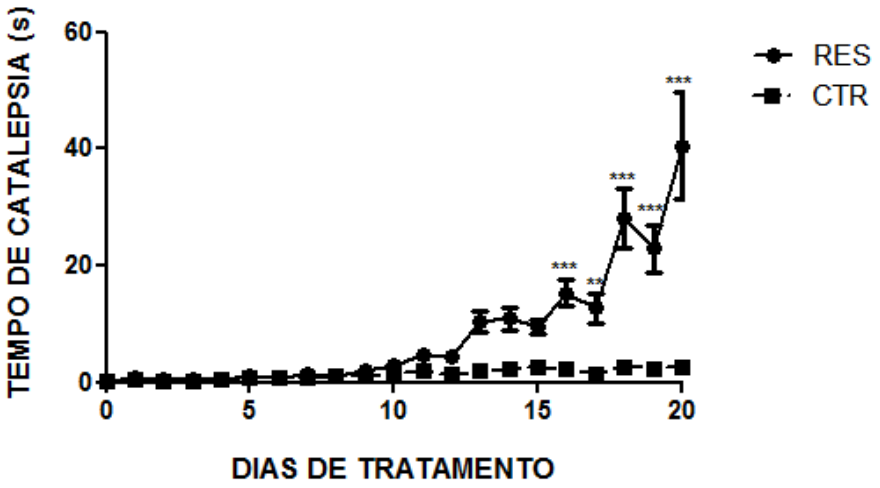

Figura 10: Efeito do tratamento repetido com RES (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) (n = 9/10 por grupo) no comportamento de catalepsia. Os valores foram expressos como média e E.P.M. *** p < 0,0001, ** p < 0,001, RES comparado ao CTR (Teste-t para amostras independentes).

5.1.2. Força de preensão – *grip strenght test*

Para a força de preensão, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias do tratamento) [F(3,51) = 5,802, p = 0.0017]. Não foram encontradas diferenças no efeito do tratamento (CTR, RES) [F(1,17) = 1,423, p = 0,2492] e da interação tempo x tratamento [F(3,51) = 0,2599, p = 0,8539]. O tratamento com a RES, comparado com o CTR, não causou diferença na força de preensão (Figura 11).

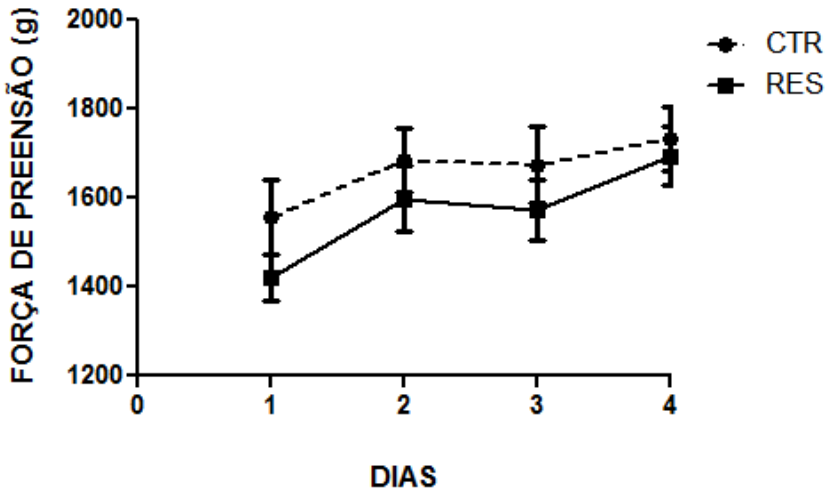

Figura 11: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 9/10 por grupo) na força de preensão. Os valores foram expressos como média e E.P.M.

5.1.3. von Frey eletrônico

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias do tratamento) [$F(20,340) = 90,96$, $p < 0,0001$], do tratamento (CTR, RES) [$F(1,17) = 46,92$, $p < 0,0001$] e da interação tempo x tratamento [$F(20,340) = 4,407$, $p < 0,0001$] para a resposta nociceptiva na pata traseira esquerda. Da mesma forma, houve efeito do tempo [$F(20,340) = 60,36$, $p < 0,0001$], do tratamento (CTR, RES) [$F(1,17) = 27,42$, $P < 0,0001$] e da interação tempo x tratamento [$F(20,340) = 3,047$, $p < 0,0001$] na pata traseira direita. Em ambos os casos, o tratamento com a RES causou diminuição no limiar de retirada da pata, ocorrendo diferença significativa do grupo RES em relação ao CTR a partir do 10º dia (48h após a 5ª injeção), permanecendo até o 18º dia (48h após a 9ª injeção), sendo o teste t para amostras independentes: [$t(17) = 10,63; 15,94; 13,33; 14,17; 9,56; 10,34; 12,65; 9,81; 12,06$] para a pata esquerda e [$t(17) = 9,26; 13,84; 11,86; 8,33; 12,20; 11,27; 19,36; 15,27; 13,58$] para a pata direita, respectivamente, do dia 10 ao dia 18 (Figura 12).

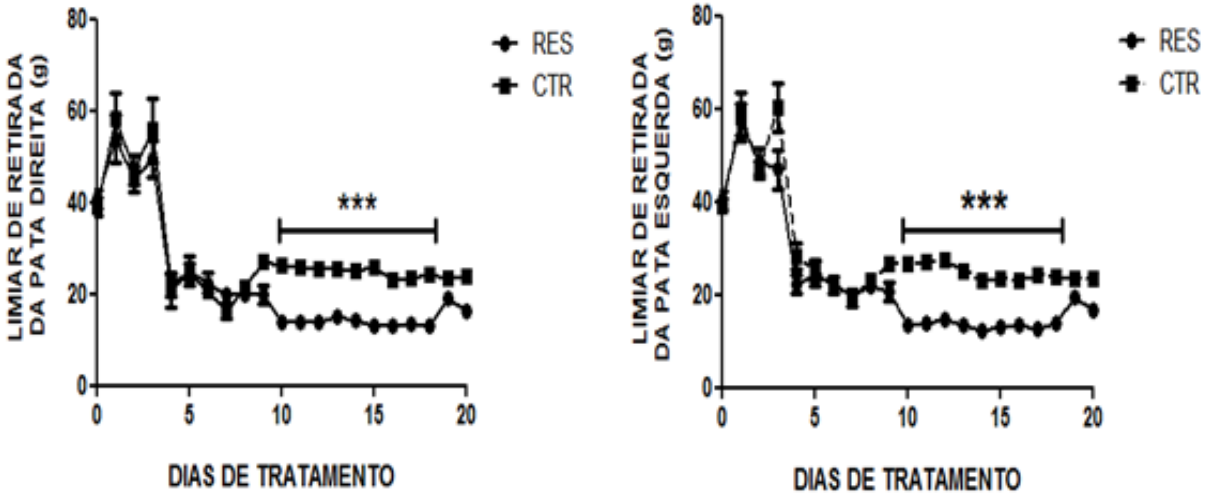

Figura 12: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 9/10 por grupo) na resposta nociceptiva. Os valores foram expressos como média e E.P.M. *** p < 0,0001, RES comparado ao CTR (Teste-t para amostras independentes).

5.2. Experimento 2

5.2.1. Comportamento de Catalepsia

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias do tratamento) [F(10,190) = 20,94, p < 0.0001] e da interação tempo x tratamento [F(10,190) = 1,983, p = 0,03], mas não demonstrou diferença no efeito do tratamento (CTR, RES) [F(1,19) = 1,082, p = 0,3113] no comportamento de catalepsia. Assim, o tratamento com a RES, comparado ao CTR, não alterou o comportamento de catalepsia entre os dias 0 e 10 (Figura 13).

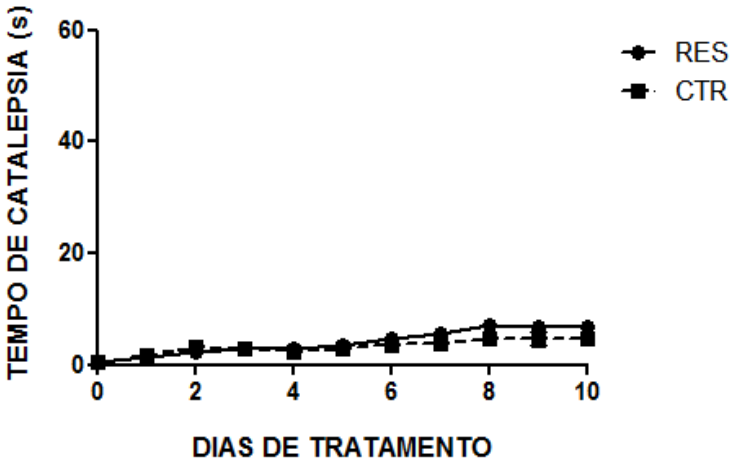

Figura 13: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 10/11 por grupo) no comportamento de catalepsia. Os valores foram expressos como média e E.P.M.

5.2.2. Teste da Formalina

Para a resposta nociceptiva diante do estímulo químico, o teste t para amostras independentes revelou diferença entre os grupos RES e CTR nos parâmetros de: latência para o início da lambida da pata (fase 1) [t(12) = 3,023, p = 0,0106] (Figura 14 – A), tempo de lambida da pata em ambas as fases, sendo [t(12) = 2,660, p = 0,0208] na fase 1 (Figura 14 – B) e [t(12) = 2,319, p = 0,0388] na fase 2 (Figura 14 – C) e número de sacudidas da pata na fase 1 [t(12) = 2,554, p = 0,0253] (Figura 14 – D). Para esses parâmetros, o tratamento com a RES aumentou a resposta nociceptiva dos animais RES comparados ao grupo CTR. Por outro lado, o teste t para amostras independentes não revelou diferença entre os grupos RES e CTR no número de sacudidas da pata na fase 2 [t(12) = 1,195, p = 0,2553] (Figura 14 – E).

5.2.4. Teste de OEAPD

Para as amplitudes de resposta coclear, o teste t para amostras independentes revelou diferença entre os grupos RES e CTR na amplitude da resposta coclear nas frequências de 2.000 Hz [t(15) = 2,372, p = 0,0315] (Figura 15 – A), de 3.000 Hz [t(15) = 2,158, p = 0,0475] (Figura 15 – B), de 4.000 Hz [t(15) = 2,175, p = 0,0461] (Figura 15 – C) e de 8.000 Hz [t(15) = 2,248, p = 0,0400] (Figura 15 – E). Nestas frequências, o tratamento com a RES provocou uma diminuição na amplitude das OEA dos animais do grupo RES comparado ao CTR. O teste t para mostras independentes não revelou diferença entre os grupos na resposta para a frequência de 6.000 Hz [t(15) = 0,1361, p = 0,8935] (Figura 15 - D). Assim, o tratamento com a RES não alterou a amplitude das OEA comparado ao grupo CTR em 6.000 Hz.

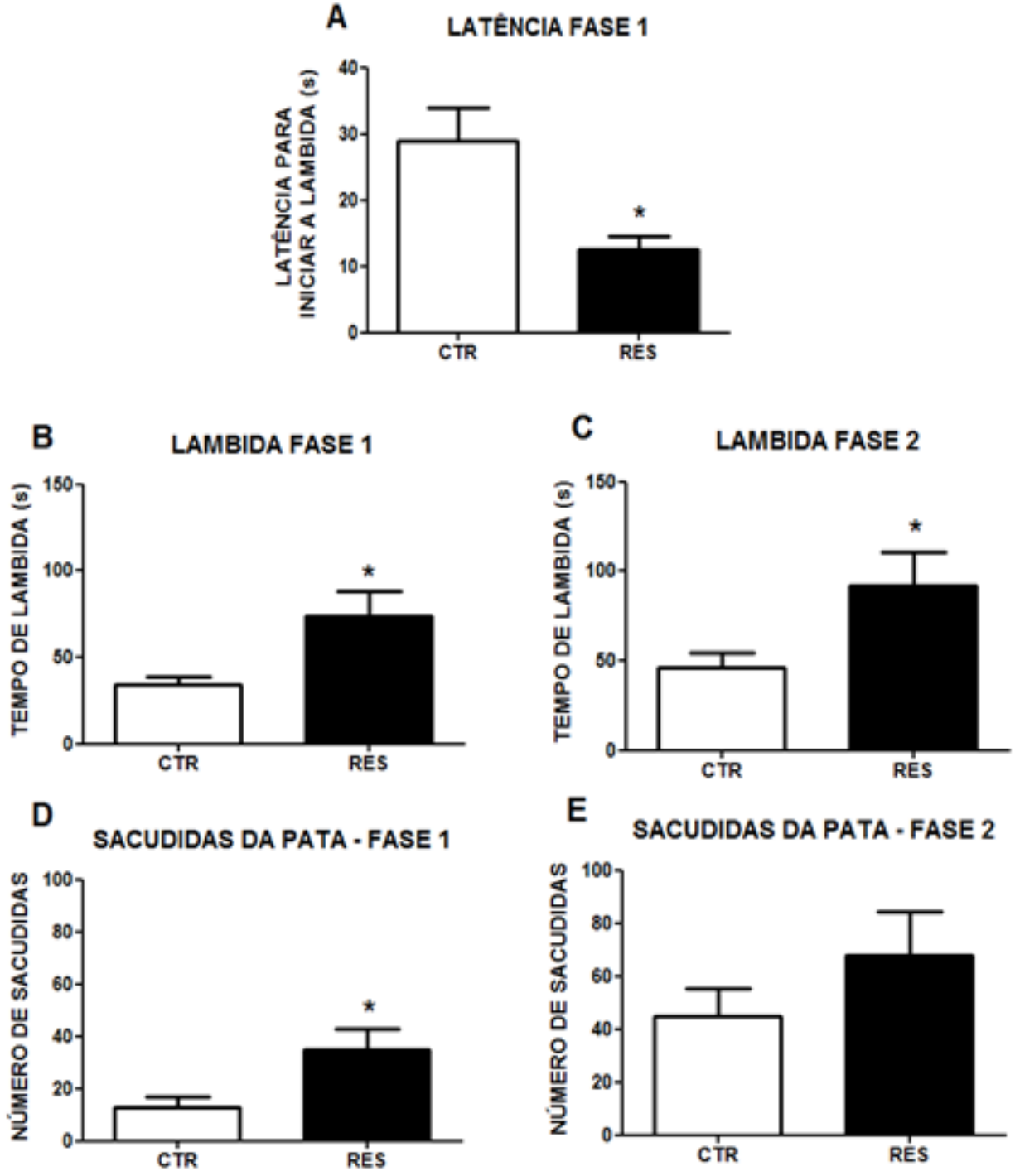

Figura 14: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 7 por grupo) na (A) latência para início da lambida; (B) tempo de lambida na fase 1; (C) tempo de lambida na fase 2; (D) número de sacudidas da pata na fase 1 e (E) número de sacudidas da pata na fase 2, no teste da formalina. Os valores foram expressos como média e E.P.M., * $p < 0,05$, RES comparado ao CTR.

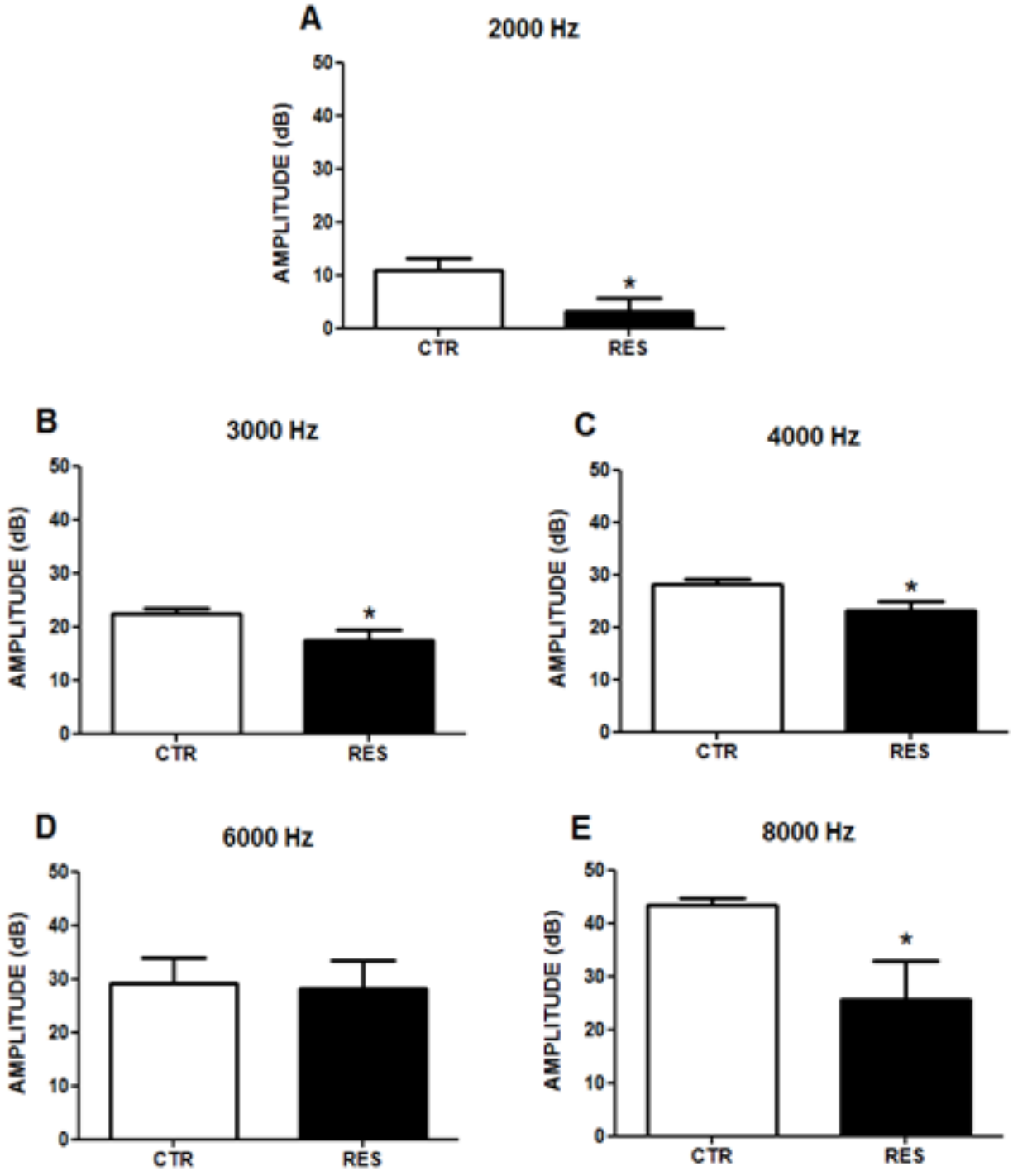

Figura 15: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 8/9 por grupo) na amplitude da resposta coclear de OEA aos estímulos nas frequências de (A) 2.000 Hz, (B) 3.000 Hz, (C) 4.000 Hz, (D) 6.000 Hz e (E) 8.000 Hz. Os valores foram expressos como média e E.P.M., * $p < 0,05$, RES comparado ao CTR.

5.3. Imunohistoquímica

5.3.1. Densitometria óptica relativa – DOR

A análise da DOR foi realizada no estriado dos animais do experimento 2, os quais foram perfundidos no dia 10 (48h após a 5ª injeção). O teste t para amostras independentes revelou uma tendência, porém sem diferença estatística, entre os grupos RES e CTR [t(8) = 2,068, p = 0,0725]. O tratamento com a RES provocou uma diminuição marginal na densidade do estriado no grupo RES (figura 16).

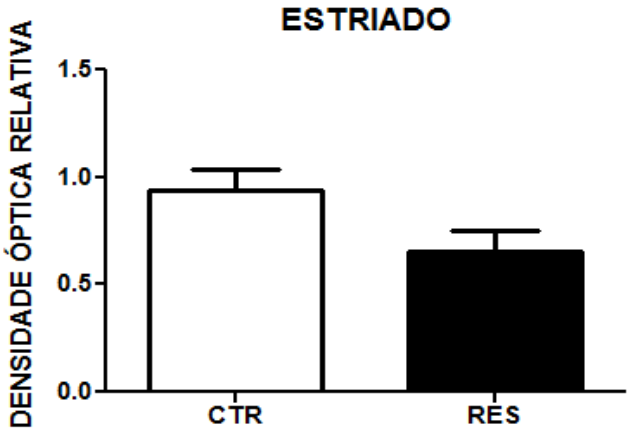

Figura 16: Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 5 por grupo) na DOR do estriado. Os valores foram expressos como média e E.P.M.

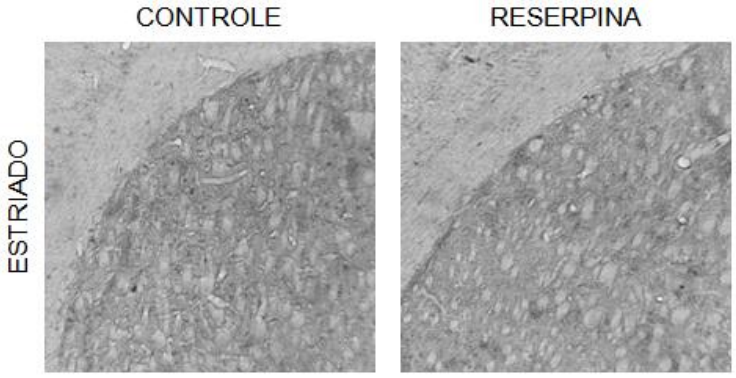

Figura 17: Imagens representativas do estiado dorsal dos animais tratados repetidamente com veículo (CTR) ou RES, no 10º dia de tratamento (48hs após a 5ª injeção).

5.3.2. Contagem de células

5.3.2.1. Tirosina Hidroxilase (TH)

Para o número de neurônios TH+ na SNpc, o teste t para amostras independentes revelou uma diferença significativa entre os grupos RES e CTR [t(8) = 2,454, p = 0,0397] (Figura 18- A). O tratamento com a RES provocou uma diminuição na quantidade de células TH+ na SNpc.

Para as células TH+ em VTA, o teste t para amostras independentes revelou diferença significativa entre os grupos CTR e RES [t(8) = 2,553, p = 0,034] (Figura 18 - B). O tratamento com a RES provocou diminuição no número de células TH+ em VTA.

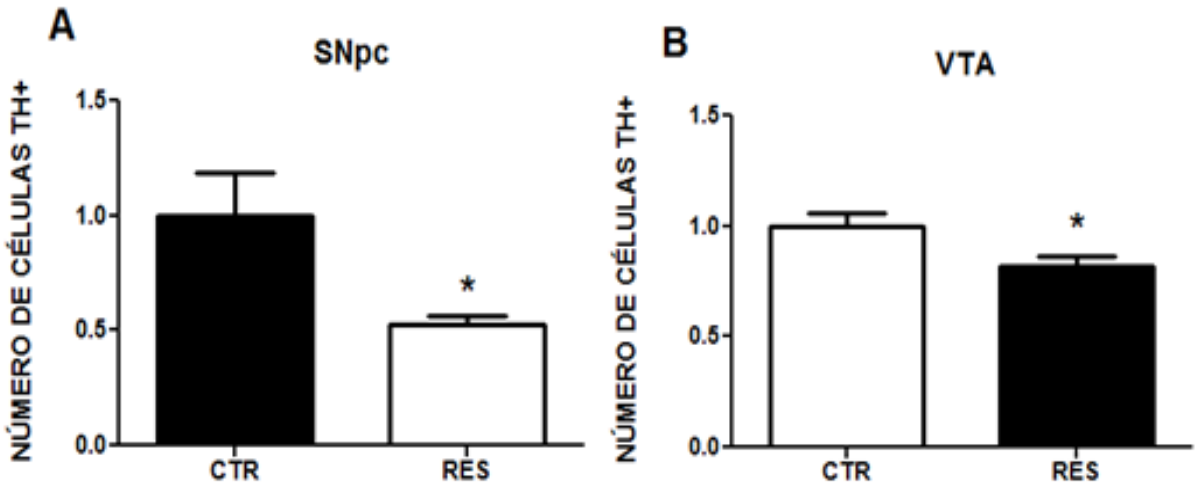

Figura 18**:** Efeito do tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) (n = 5 por grupo) na quantidade de células TH+ em (A) SNpc e (B) VTA dos animais do experimento 2. Os valores foram expressos como média e E.P.M. * p < 0,05, RES comparado ao CTR.

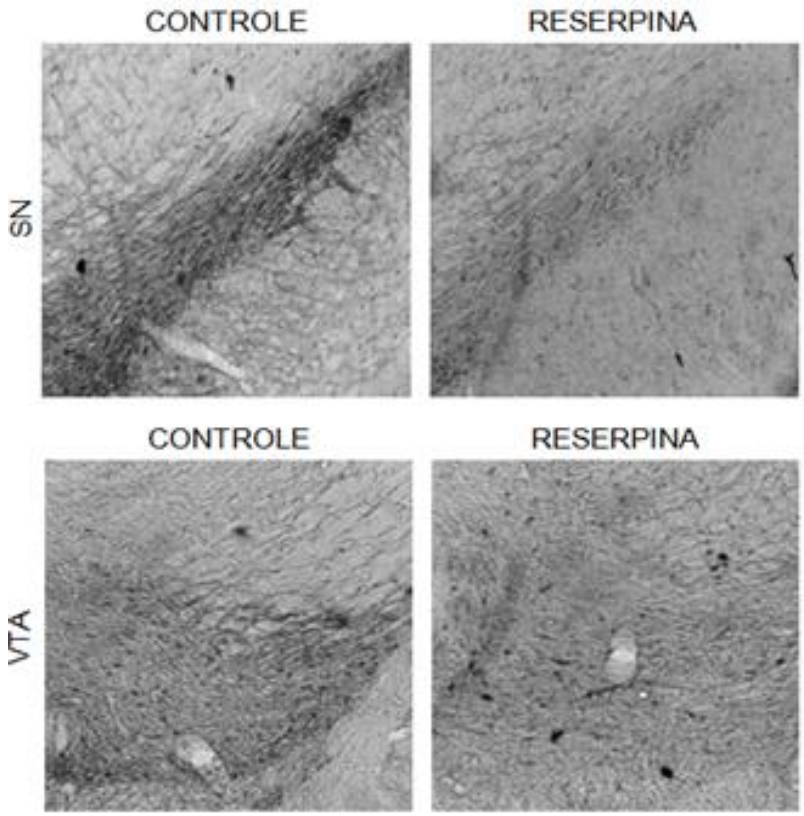

Figura 19: Imagens representativas da SNpc e de VTA dos animais tratados repetidamente com veículo (CTR) ou RES, no 10º dia de tratamento (48hs após a 5ª injeção).

5.3.2.2. c-FOS

O teste t para amostras independentes revelou diferença entre os grupos CTR e RES nas três regiões analisadas para c-FOS: [t(11) = 3,977, p = 0,0022] na vlPAG (Figura 20 - A), [t(8) = 3,024, p = 0,0165] no RVM (Figura 20 - B) e [t(8) = 2,599, p = 0,0317] no NDR (Figura 20 – C). O tratamento com a RES provocou aumento da atividade dos neurônios da PAG, do RVM e do NDR.

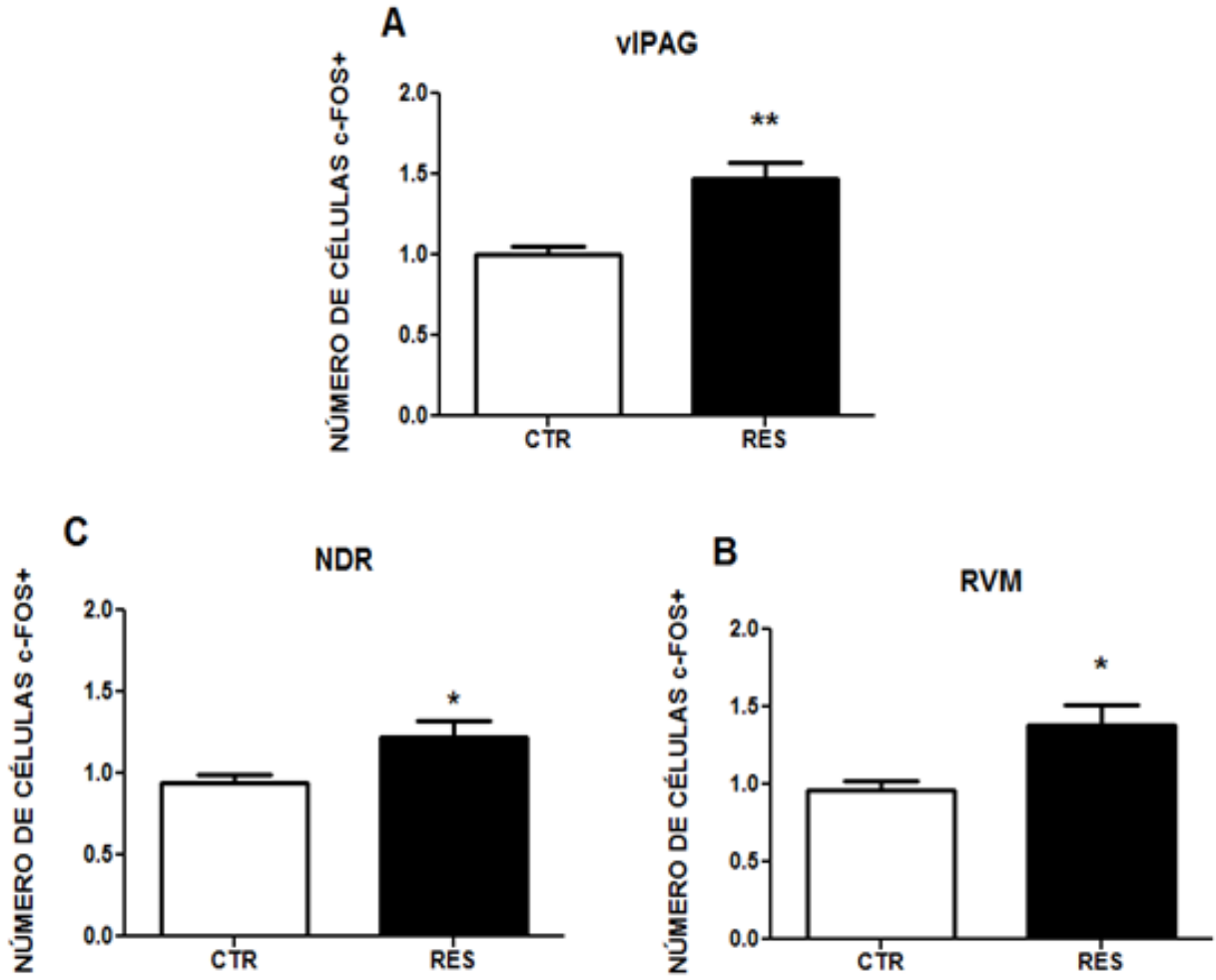

Figura 20: Efeito do estímulo nociceptivo após tratamento repetido com RES ou veículo (CTR) na quantidade de células c-FOS+ em (A) vlPAG (n = 6/7 por grupo), (B) RVM (n = 5/6 por grupo) e (C) NDR (n = 5/6 por grupo) no 10º dia de tratamento. Os valores foram expressos como média e E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, RES comparado ao CTR.

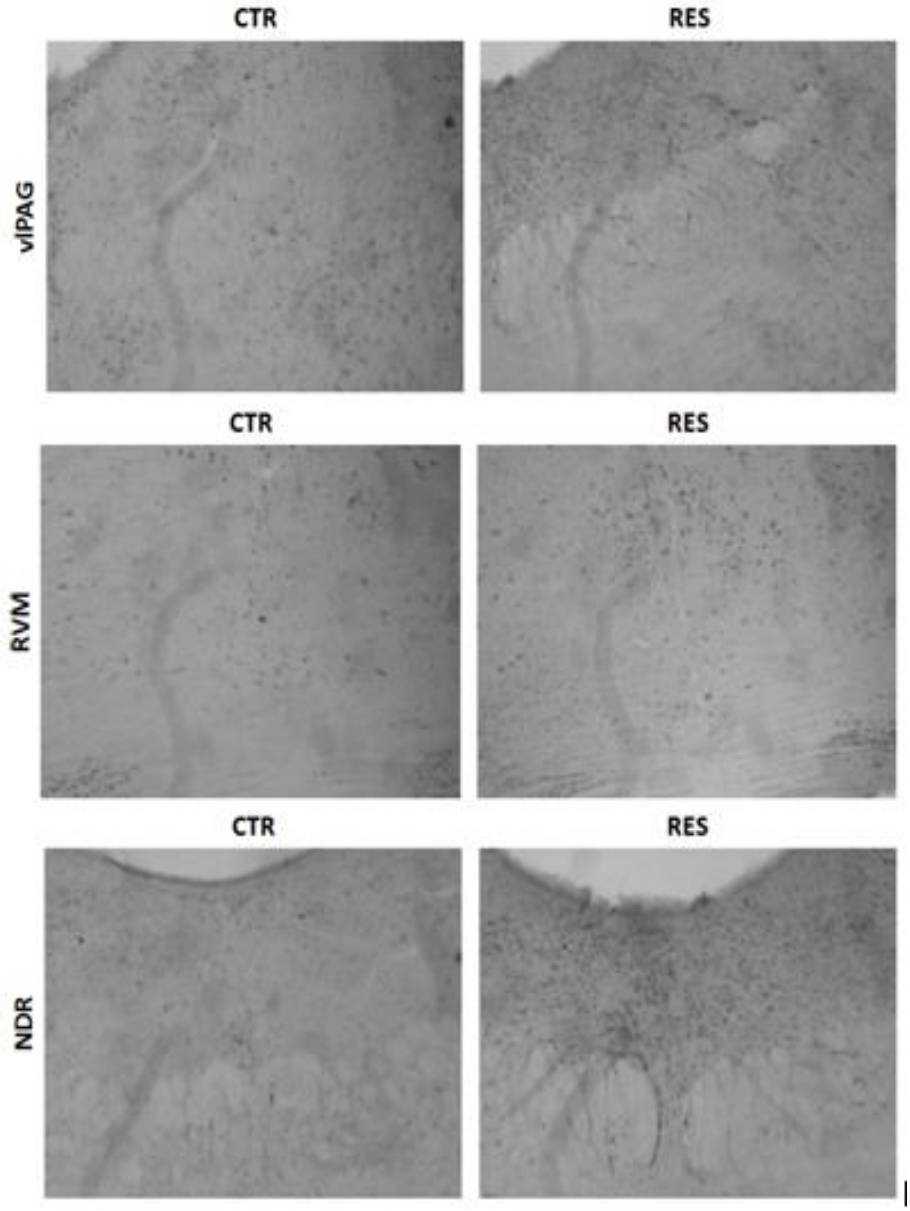

Figura 21: Imagens representativas do NDR, da PAG e do RVM dos animais tratados repetidamente com veículo (CTR) ou RES, após estímulo nociceptivo, no 10º dia de tratamento (48hs após a 5ª injeção).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos o modelo baseado na administração repetida de baixas doses de RES (0,1 mg/kg, s.c.) para a indução do parkinsonismo (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Visamos avaliar, concomitantemente, os parâmetros motores de catalepsia e força muscular e os parâmetros sensoriais de nocicepção e audição, bem como as alterações neuroquímicas relacionadas com os aspectos comportamentais analisados no estudo. Mostramos que o tratamento com a RES induziu alterações motoras progressivas a partir do 16º dia, além de alterações nociceptivas e auditivas que antecederam as alterações motoras, enquanto o parâmetro de força muscular não se alterou em nenhum momento do tratamento. Sob o ponto de vista neuroquímico, no 10º dia (fase pré-motora), ocorreram reduções na quantidade de células TH+ na SNpc e em VTA dos animais tratados com a RES ao passo que, os níveis de TH na região do estriado não se alteraram. Quanto à imunomarcação para c-FOS, no 10º dia, o estímulo nocivo provocou aumento na quantidade de células c-FOS+ nas regiões do NDR, vlPAG e RVM nos animais tratados com a RES.

A catalepsia – fracasso para corrigir uma postura imposta externamente – é uma medida de acinesia e é avaliada pelo teste de barra (teste de catalepsia). A acinesia, por sua vez, representa a dificuldade em iniciar um movimento, característica comumente observada em humanos com a DP (HUGHES et al., 1992). A partir de seus resultados, Santos (2012) concluiu que a catalepsia é um bom parâmetro para avaliar os sinais motores do parkinsonismo, tanto por sua progressão ao longo e após o tratamento, quanto pela forte relação com a hipofunção nigroestriatal.

No presente estudo, o comportamento de catalepsia foi avaliado ao longo de 20 dias. Mostramos que o tratamento repetido com baixas doses de RES foi capaz de alterar, a partir do 16º dia, a função motora dos ratos tratados (figura 10), evidenciando um período ao longo do tratamento (do dia 1 ao dia 15), que denominamos de fase pré-motora. Nesta fase, a depleção monoaminérgica não influenciou a função motora, que se manteve preservada. Nossos dados corroboram os apresentados anteriormente por Fernandes et al. (2012) e Santos et al. (2013), que utilizaram o mesmo modelo de indução e encontraram alterações motoras apenas em fases mais adiantadas do tratamento (dias 16 e 14, respectivamente). Esses dados também estão de acordo com uma vasta literatura reportando que os SM clássicos da DP em humanos manifestam-se apenas em fase mais avançada do processo de neurodegeneração, quando 60% a 80% dos neurônios nigroestriatais já estão destruídos (HORNYKIEWICZ, 1998; TEIVE, 2005; TISSINGH, 1998; SHARMA et al., 2013).

No experimento 2, mostramos que o tratamento com a RES não foi capaz de afetar o padrão motor dos animais até o 10º dia. Verificou-se efeito do tempo, revelado pela ANOVA. Tal efeito relaciona-se com a habituação dos animais ao teste, decorrente de sua reexposição à mesma tarefa. O teste de catalepsia foi incorporado ao experimento 2 no intuito de monitorar a função motora ao longo do tratamento, visto que o objetivo era encontrar alterações de natureza sensorial que antecedessem as alterações motoras. Assim, através desse resultado, pudemos constatar que, ao longo dos 10 dias de tratamento, alterações motoras não influenciaram a resposta dos animais nos outros testes comportamentais.

Uma ampla gama de funções e comportamentos motores estão sob o controle de circuitos dos NB mediados pela DA, alguns dos quais são afetados pelo tratamento com a RES (HUTTER-SAUNDERS et al., 2012). No presente estudo, a imunomarcação para TH – enzima que catalisa o primeiro passo na síntese da catecolamina – mostrou, no 10º dia de tratamento, reduções significativas no número de neurônios dopaminérgicos na SNpc nos cérebros dos animais tratados com a RES (figura 17).

Os neurônios que se originam na SNpc enviam projeções para o corpo estriado, formando a via nigroestriatal. Tal via, por sua vez, relaciona-se com a estimulação do movimento intencional. Alterações na via nigroestriatal podem determinar a síndrome parkinsoniana composta pelos SM clássicos da DP (STANDAERT; GALANTER, 2009). Contudo, no 10º dia do tratamento, os animais do grupo RES não haviam manifestado alterações motoras características do parkinsonismo, demonstrando que a redução no número de células TH+ na SNpc não foi suficiente para influenciar o desempenho motor dos animais nessa altura do tratamento. Corroborando essa relação, observamos que os níveis de DA no estriado não se reduziram significativamente nesta etapa do tratamento (figura 16), o que demonstra uma possível compensação do sistema, ao nível estriatal, para a redução dos neurônios dopaminérgicos na SNpc.

Os neurônios dopaminérgicos que se originam em VTA enviam, por sua vez, suas projeções para o córtex pré-frontal e para o núcleo acumbens, formando, respectivamente, as vias mesocortical e mesolímbica. São sistemas que desempenham um papel importante e complexo na motivação, no pensamento orientado para metas, na regulação do afeto e no reforço positivo (STANDAERT; GALANTER, 2009). Estudos prévios apontam que a depressão, a ansiedade e a apatia parecem ter relação com a diminuição da transmissão dopaminérgica nestas vias e que a depressão pode aparecer em estágios iniciais ou preceder os SM em vários anos, na fase pré-motora da DP (BONNET et al., 2012). Nosso achado neuroquímico em VTA demonstrou que, no 10º dia, a neurodegeneração afetou outros

núcleos dopaminérgicos distintos da via nigroestriatal. Isso reforça a ideia de que a neurodegeneração pode afetar áreas extranigrais em fases iniciais do processo patológico, determinando, assim, alterações de natureza não motora que ocorrem em fase pré-motora da progressão da doença (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; GALVAN, et al., 2015).

Embora tenhamos observado que o comportamento de catalepsia – que reflete uma função motora – mostrou-se alterado num estágio avançado do tratamento com a RES (16º dia), o mesmo não ocorreu em relação à força de preensão, conforme evidenciado pelo *grip strenght test* (figura 11).

Frazzitta et al. (2015) utilizaram um dinamômetro isocinético para quantificar a força muscular dos membros inferiores de humanos no estágio médio da DP, em comparação aos controles pareados. Os pesquisadores não observaram diferença na força muscular dos doentes com Parkinson em relação aos controles e consideraram que a força muscular não é um fator discriminativo entre um sujeito com ou sem Parkinson. Corcos et al. (1996) mostraram que existe uma distribuição assimétrica da fraqueza muscular na DP e que a diminuição da força muscular tem relação com a evolução do quadro clínico do paciente.

De acordo com o nosso achado, podemos formular a hipótese de que a força muscular não se altera em estágios iniciais e intermediários da DP. Encontraríamos prováveis alterações de força nos animais tratados em estágios mais avançados da depleção dopaminérgica, caso o tratamento se mantivesse por mais de vinte dias. As mesmas alterações, no entanto, poderiam ser confundidas com as alterações motoras presentes nos animais a partir do 16º dia.

Ainda em relação a esse tema, Hutter-Saunders et al. (2012) mostraram que funções motoras controladas pelos núcleos da base (NB) podem ser fielmente usadas como uma medida da integridade nigroestriatal em modelos experimentais. Ainda segundo esses autores, danos na SNpc ou a falta de neurotransmissão no CPu causa notáveis déficits nas funções motoras que podem prejudicar desde o caminhar até os movimentos mais refinados, como o *grooming.* Os autores avaliaram o comportamento motor de camundongos após a administração aguda de MPTP. Observaram que os animais apresentaram alterações significativas nos testes do *rota-rod* e do campo aberto, embora não tenham encontrado alterações nos testes de resistência de impressão de tinta com a pata e de força de preensão (*grip test*). Afirmam assim que, possivelmente, as funções motoras avaliadas pelos últimos testes (como a força muscular) não são funções controladas pelos circuitos dos NB.

Conforme mencionado anteriormente, o efeito do tempo revelado pela ANOVA para esse teste foi, também, atribuído à habituação dos animais, visto que o mesmo grupo de animais foi submetido várias vezes à tarefa.

Alterações não motoras (sensoriais), por sua vez, foram evidenciadas antes do 16º dia de tratamento. Os animais tratados com a RES manifestaram hipersensibilidade ao estímulo mecânico, que se iniciou no 10º dia (fase pré-motora) e permaneceu até o 18º dia (fase motora), observada no teste do von Frey (figura 12). Esse dado é corroborado na literatura e reforça a ideia de que a nocicepção seja um sintoma precoce do parkinsonismo (BONNET et al., 2012; LEE et al., 2006).

Braak et al. (2003), mostraram em seu estudo, que estruturas como o LC noradrenérgico, os núcleos da rafe, e o núcleo reticular gigantocelular são acometidas no estágio 2 do parkinsonismo, antes da SNpc, a qual se degenera no estágio 3, conforme demonstrado na tabela 1 (BRAAK et al., 2003). Assim, o aumento na sensibilidade nociceptiva poderia estar relacionado com a degeneração precoce dessas estruturas não dopaminérgicas, envolvidas na inibição da percepção da dor (SZABADI, 2012). Corroborando essa ideia, através da imunomarcação para c-FOS, realizada na fase pré-motora, mostramos que importantes estruturas integrantes do sistema modulatório da dor encontram-se mais ativas nos animais com parkinsonismo (figuras 20 e 21).

Poderíamos, ainda, relacionar a hipersensibilidade nociceptiva dos ratos do grupo RES com a diminuição da quantidade de neurônios nigrais observada na imunomarcação para TH (figura 17). Essa possível relação, decorre da verificação de que embora a redução na quantidade de células TH+ na SNpc e nos níveis de DA no estriado, no 10º dia de tratamento, não tenham afetado o desempenho motor dos animais com parkinsonismo, essa redução foi suficiente para aumentar a sensibilidade desses animais aos estímulos nociceptivos (mecânico e químico). Tal constatação reforça a ideia de que a SNpc esteja relacionada com o processamento nociceptivo. Esse dado corrobora a afirmação de Tassoreli et al. (2007) de que pequenas alterações na transmissão do sistema dopaminérgico mesoestriatal podem afetar o processamento da sensibilidade dolorosa. Segundo esses autores, a combinação dos resultados de seus estudos com a literatura leva à hipótese de que lesões nigroestriatais alteram o funcionamento do que eles chamam de sistema medial da dor, que vem a ser o circuito neural envolvido nos aspectos motivacional-afetivo e cognitivo-avaliativo da dor, assim como na memória para a dor e nas respostas autonômicas aos estímulos nocivos. Em seu estudo, Barasi (1979) demonstrou que 50% das células da SNpc respondem a estímulos nocivos. Da mesma forma, Chudler e Dong (1995) apontaram, a partir de estudos prévios, a participação dos neurônios nigrais na modulação da dor.

Ainda em relação ao teste do von Frey, observamos que a resposta de hiperalgesia manifestada pelos animais tratados com a RES perdurou até o 18º dia do tratamento,

igualando-se à dos animais CTR nos dias 19 e 20 (figura 12). Considerando que alterações motoras foram observadas nos animais tratados a partir do 16º dia (figura 10), é possível supor que essas alterações influenciaram na resposta comportamental ao teste de nocicepção por estímulo mecânico, interferindo na avaliação do comportamento de dor após o início dos sintomas motores. Em seu estudo, Chudler e Dong (1995) enfatizaram que a maior dificuldade dos estudos farmacológicos que testam efeitos comportamentais de dor após indução de alterações nos NB, é separar os efeitos relacionados com a hiperalgesia daqueles relacionados com os fenômenos motores. A manipulação farmacológica dos NB pode mudar a habilidade de um animal de responder ao estímulo doloroso, mas pode não afetar a sensação ou percepção de um evento nocivo.

Assim, no presente estudo, com base apenas no comportamento, não se pode afirmar se as alterações motoras impediram que os ratos manifestassem o comportamento nociceptivo após o 16º dia, ou se a percepção da dor realmente diminuiu com o avanço da depleção monoaminérgica. Seriam necessárias outras análises neuroquímicas nesse período do parkinsonismo para esclarecer essa questão. Além disso, poderia ser utilizado outro teste nociceptivo que não exija uma resposta motora do animal para avaliar se a nocicepção permanece aumentada após a fase motora do parkinsonismo.

Outro dado importante relacionado à resposta nociceptiva foi a simetria de resposta para ambas as patas avaliadas no teste do von Frey (figura 12). Em seu estudo, Tassoreli e colaboradores (2007) induziram o parkinsonismo com injeções i.c.v. unilaterais de 6-OHDA e testaram a resposta nociceptiva dos ratos no teste da formalina. Eles concluíram que lesões unilaterais da transmissão dopaminérgica central interrompem os mecanismos neurais responsáveis pela adequada integração do estímulo doloroso, particularmente no hemicorpo ipsilateral à denervação dopaminérgica.

Takeda e colaboradores (2005) avaliaram o papel do sistema dopaminérgico mesoestriatal no processamento da dor, através da resposta de retirada da pata traseira ao estímulo mecânico no teste do von Frey, em três momentos (1,4 e 12 semanas) após a administração i.c.v. unilateral de 6-OHDA. Os autores observaram que a latência na retirada da pata ao estímulo ipsilateral foi significativamente menor para os ratos tratados em relação aos controles nos três momentos analisados. Já, em relação à pata contralateral à lesão, não houve diferença na latência entre os grupos. Os autores concluíram que a depleção dopaminérgica causa hipersensibilidade ao estímulo mecânico no hemicorpo ipsilateral, sugerindo que o sistema dopaminérgico pode estar envolvido no processamento sensorial, incluindo o da dor induzida por estímulo mecânico.

Ogata et al. (2015) causaram lesões no sistema nigroestriatal através de injeções bilaterais de 6-OHDA e realizaram a avaliação do limiar de retirada de ambas as patas no teste do von Frey. Eles observaram que não houve diferença significativa em relação à lateralização dos limiares de retirada das patas, optando-se, então, por considerar a média das duas patas para determinar as diferenças entre os grupos.

Foram encontrados três estudos que utilizaram a RES como modelo de indução de dor neuropática e avaliaram a resposta dos animais ao teste do von Frey. Todos, contudo, trabalharam com a estimulação em apenas uma das patas traseiras (ARORA et al., 2011; KANEKO et al., 2014; NAGAKURA et al., 2012).

De acordo com a literatura médica, em fases iniciais, sinais e sintomas motores da DP podem manifestar-se unilateralmente, e esta unilateralidade pode durar por muito tempo, antes que os sintomas se tornem bilaterais (WANG et al, 2015). Em seu estudo que analisou a assimetria do dano nigroestriatal em estágios precoces da DP, Wang et al. (2015) avaliaram pacientes com DP idiopática em estágios iniciais através de técnicas de neuroimagem. Eles observaram que havia diferenças significativas entre o hemisfério sintomático e o não sintomático em estágios precoces da DP idiopática.

Kempster et al. (1989) apontaram que a assimetria dos SM na DP é associada com a depleção assimétrica de DA na SN e que isto levaria a um desequilíbrio assimétrico do estriado, com consequente disfunção assimétrica dos circuitos neurais, incluindo os NB e as áreas corticais. Esses achados suportam a ideia de que, nos seres humanos, a neurodegeneração ocorre, inicialmente, de maneira assimétrica.

É importante considerar que, nos modelos experimentais de indução farmacológica de alterações no SNC, o processo neuropatológico ocorre de forma induzida. Dessa forma, no modelo experimental que utilizamos, a indução do parkinsonismo é feita através da depleção sistêmica das monoaminas, o que, possivelmente, explicaria a manifestação bilateral do comportamento nociceptivo.

Por fim, houve outro aspecto no teste do von Frey relacionado com a hiperalgesia apresentada pelos animais de ambos os grupos, em ambas as patas, a partir do 4º dia do teste (figura 12). Não foram encontrados resultados semelhantes na literatura pesquisada. Entretanto, consideramos que houve uma habituação dos animais ao estímulo mecânico, uma vez que o teste foi repetido ao longo de vários dias consecutivos e, a exemplo do que ocorre em outros testes comportamentais, a reexposição dos animais de ambos os grupos à mesma condição ocasionou, possivelmente, esse efeito de habituação do 4º dia em diante.

No presente estudo, mostramos que os animais com parkinsonismo também apresentaram uma hipernocicepção para o estímulo químico em fase pré-motora do parkinsonismo (figura 14). O teste da formalina foi realizado no dia 10, mesmo momento em que os animais do grupo RES, no experimento 1, começaram a manifestar uma hipersensibilidade ao estímulo mecânico (figura 12). Esses resultados mostraram que as alterações na sensibilidade nociceptiva, tanto para o estímulo mecânico quanto para o estímulo químico, ocorrem em fases iniciais da depleção monoaminérgica.

Encontramos, na literatura, pequenas variações entre os protocolos de observação para o teste da formalina (BARROT, 2012; CAPONE; ALOISI, 2004; LE BARS, et al., 2001; LUIZ et al., 2007; TASSORELI et al., 2007). De acordo com Capone e Aloisi (2004), as variações nos protocolos para a realização do teste da formalina – tanto em relação à dose e à concentração, como em relação aos tempos de observação – podem influenciar fortemente os resultados dos estudos.

Nossa escolha pela observação dos animais entre 0 e 5 minutos para a fase 1 e entre 15 e 30 minutos para a fase 2 baseou-se em alguns estudos prévios (LUIZ et al., 2007; RABELO et al., 2013), e foi adequada, principalmente, à nossa necessidade metodológica em relação ao tempo de realização das perfusões, uma vez que para a realização da imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH), os animais teriam que ser todos perfundidos no mesmo dia e antes do anoitecer. Poderíamos, entretanto, a partir de nosso resultado, hipotetizar que, se o tempo de observação fosse um pouco mais longo, encontraríamos, possivelmente, a diferença entre os grupos para o parâmetro de sacudidas da pata na fase 2.

Outro aspecto que pode ser levado em conta relaciona-se com a observação de Tassoreli e colaboradores (2007). Nesse estudo, os autores encontraram um aumento no número de sacudidas da pata nos animais com lesão nigroestriatal em ambas as fases de observação. Porém, observaram que, na segunda fase, a resposta foi caracterizada por um aumento mais lento no número de sacudidas da pata, seguido por um prolongamento desse comportamento em relação aos animais controles, quando comparado com o aumento na fase 1. Além disso, em seu estudo, Sufka e colaboradores (1998) analisaram quais seriam os parâmetros mais confiáveis para se testar a resposta comportamental nociceptiva em camundongos. Eles concluíram que a resposta nociceptiva, na segunda fase, é mais bem caracterizada pelo tempo de lambida da pata injetada do que por outros parâmetros como o número de sacudidas da pata.

A PAG, o RVM e o NDR são importantes regiões relacionadas com a modulação da dor, nas quais a proteína FOS é facilmente expressa. Em virtude disso, estas três áreas foram nossas escolhidas para a análise. Corroborando os resultados encontrados para os testes comportamentais de nocicepção, observamos que os animais do grupo RES mostraram uma quantidade significativamente maior de células c-FOS+ nos três núcleos analisados, após o estímulo da formalina (figura 18).

Atualmente é aceita a existência de mecanismos endógenos, moduladores da dor, que funcionam através de um circuito de fibras descendentes originárias de múltiplas áreas, como o hipotálamo, a amígdala e o córtex cingulado rostral anterior, direcionadas para a PAG, a qual envia projeções para o RVM. Os neurônios do RVM projetam-se, por sua vez, para o CDME, visando, direta ou indiretamente, aumentar ou diminuir o tráfego nociceptivo, modulando a sensação da dor (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Esse sistema descendente é sensível aos transmissores opióides e a serotonina é o principal neurotransmissor liberado a partir do RVM. A noradrenalina não é um neurotransmissor presente nas regiões da PAG e do RVM, entretanto, se faz presente através de projeções do LC para a PAG e o RVM (OSSIPOV et al., 2010). Além disso, dentro do circuito do RVM existe uma base neural que exerce um controle bidirecional sobre a dor. É formada por duas populações de neurônios – as células *on* e as células *off* – que são recrutadas distintamente para aumentar ou inibir a dor (HEINRICHER et al., 2009).

Alguns estudos apontam um potencial envolvimento desse sistema na DP, a partir da constatação da presença, em doentes com Parkinson, de corpos de Lewy em muitos núcleos que compõem essa rede nociceptiva (BRAAK et al., 2000; BRAAK et al., 2003). Existe também a ideia de que a SNpc, via células da rafe, desempenha influência sobre os centros espinhais e supraespinhais, como a PAG, envolvidos na nocicepção (REYES; MITROFANIS, 2008).

Na literatura, encontramos alguns estudos que analisaram, em modelos de parkinsonismo, a expressão de FOS nas áreas modulatórias da dor. Em todos eles ocorreram diferenças na quantidade de células imunomarcadas para c-FOS, em núcleos da via nociceptiva dos animais tratados, em relação aos animais controles.

Tassoreli et al. (2007) utilizaram o modelo da 6-OHDA para induzir o parkinsonismo em ratos e testaram o efeito da lesão nigroestriatal na expressão de c-FOS no núcleo paraventricular do hipotálamo (do inglês, paraventricular nucleus [PVN]), o qual participa do sistema de mediação do aspecto motivacional-afetivo da dor. Eles utilizaram o estímulo da formalina e observaram nos animais com lesão nigroestriatal unilateral, em comparação com

os controles, uma diminuição da expressão de c-FOS no PVN. Os autores concluíram que lesões unilaterais da transmissão dopaminérgica central interrompem o mecanismo que controla a integração do estímulo de dor, particularmente no hemicorpo ipsilateral à denervação.

No estudo de Ogata et al. (2015) em ratos tratados bilateralmente com 6-OHDA, a injeção de formalina na pata traseira induziu a expressão da proteína c-FOS no CDME do mesmo lado da pata injetada com a formalina, indicando uma hiperatividade dos neurônios do CDME nos animais tratados em resposta ao estímulo tônico químico.

Reyes e Mitrofanis (2008) estudaram o padrão de expressão de FOS na ME e na PAG em ratos com hemiparkinsonismo induzido pela administração de 6-OHDA. Os ratos foram submetidos a um estímulo mecânico na pata traseira e duas horas depois foram perfundidos e seus cérebros analisados através da imunohistoquímica para TH e c-FOS. Eles encontraram uma expressão muito mais evidente de células FOS+ tanto na PAG quanto na ME dos ratos tratados com a 6-OHDA do que dos ratos controles (tratados com salina). Os autores concluíram que esses resultados sugerem um substrato para algumas anormalidades nos circuitos sensoriais nociceptivos que podem ser evidentes em casos de Parkinson.

Corroborando os resultados dos vários estudos prévios em modelos de parkinsonismo, nosso resultado reforça a existência de diferenças relevantes na atividade celular da via modulatória da dor entre os animais normais e os animais com parkinsonismo. Sabemos que em nosso modelo experimental, ocorre a depleção de dopamina, noradrenalina e serotonina, que são monoaminas importantes no processo de modulação da dor. Como em nosso estudo quantificamos apenas áreas dopaminérgicas imunomarcadas para TH, poderíamos sugerir que reduções nos níveis de dopamina influenciaram a modulação da dor nos animais do grupo RES. Essa hipótese é suportada pela literatura, na medida em que estudos prévios mostraram que alterações no sistema dopaminérgico nigroestriatal afetam o processamento da sensibilidade dolorosa (TASSORELI et al., 2007) e que 50% das células da SNpc respondem a estímulos nocivos (BARASI, 1979).

Poderíamos, no entanto, pensar em outros mecanismos não investigados neste estudo, como o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico ou a participação de áreas corticais relacionadas com a dor, como os córtices cingulado anterior, insular e somatossensorial primário. Fazem-se necessários, todavia, mais estudos para esclarecer a participação dos mecanismos neuroquímicos por trás dessas alterações no funcionamento da via nociceptiva nos animais com parkinsonismo.

Em relação à função auditiva, no 8º dia de tratamento (fase pré-motora), encontramos amplitudes de respostas de OEA significativamente mais baixas nos animais do grupo RES, quando comparadas com os animais CTR (figura 15), o que pode ser um indicativo do início de sofrimento das células que compõem o órgão de Corti, por agressão em sua estrutura. Esse efeito foi, provavelmente, causado por um aumento da suscetibilidade dos animais RES ao ruído ambiental, uma vez que a depleção dopaminérgica leva, possivelmente, à diminuição nos níveis de DA no TOL, o que resulta na interrupção da proteção exercida pelo TOL sobre as CCI, tornando a cóclea suscetível a lesões pela superestimulação acústica. De acordo com alguns estudos, há evidências de que a perfusão de DA na cóclea diminui a atividade espontânea e som-evocada no nervo coclear (RUEL et al., 2001). Esta ação dopaminérgica é importante na minimização da excitotoxicidade do glutamato na sinapse aferente entre as CCI e o nervo coclear, durante a superestimulação acústica (DARROW et al., 2006). Assim, pode-se supor que uma diminuição da relação sinal/ruído no teste de OEAPD poderia advir da redução na amplitude das respostas de energia das CCE, uma vez que estas já estariam em processo de alteração estrutural/funcional provocado pela falta de proteção do sistema contra o ruído. Um recente estudo desenvolvido por Maison et al. (2012) apontou fortes evidencias de uma comunicação entre o TOL e o TOM controlando a atividade das células ciliadas na cóclea. Desta forma, a qualquer sinal de suscetibilidade do sistema TOL – CCI haveria uma modificação no desempenho das CCE, que se manifestaria através de uma diminuição das respostas de OEA, a fim de compensar essa fragilidade.

Confirmando nossos resultados, Vitale et al. (2012) avaliaram a incidência de perda auditiva em indivíduos com Parkinson. Eles concluíram que em função da alfa-sinucleina estar localizada predominantemente no sistema neuronal eferente (feixe olivococlear) dentro da orelha interna, isto poderia afetar a suscetibilidade dos indivíduos com DP a perdas auditivas induzidas pelo ruído ou a presbiacusia – perda auditiva relacionada ao envelhecimento.

De acordo com vários estudos, as alterações auditivas nos humanos provocadas por superestimulação acústica iniciam-se na região de frequências agudas (3.000, 4.000 e 6.000Hz) e estendem-se, progressivamente, para frequências mais agudas, médias e graves (8.000, 2.000, 1.000, 500 e 250 Hz, respectivamente) (ARAÚJO, 2002). Em nosso estudo optamos por analisar apenas as frequências de 2.000 a 8.000 Hz porque, de acordo com a literatura, as OEAPD são mais limitadas nas frequências baixas, nas quais o ruído apresenta maior interferência sendo melhor o desempenho no teste nas frequências acima de 2.000Hz (AZEVEDO, 2003). Possivelmente, em nosso estudo, a exposição aos ruídos ambientais sem

a proteção exercida pela DA às CCI, foi suficiente para causar alterações cocleares abrangentes também às frequências médias.

Não encontramos alterações na frequência de 6.000Hz. Esse resultado diverge da literatura, já que estudos indicam que essa frequência é uma das primeiras a sofrerem alterações pela superexposição ao ruído em humanos (BOGER et al., 2009). Outros estudos, entretanto, reportam que, em humanos, especificamente nesta frequência, há risco da ocorrência do efeito de onda estacionária, a depender da forma como o fone é posicionado no conduto auditivo externo no momento da avaliação funcional auditiva, ocasionando falsas alterações nos limiares auditivos dessa frequência (MOMENSOHN-SANTOS; RUSSO, 2005; ALMEIDA; NISHIMORI, 2006). Segundo Lim e Dunn (1979) existem alguns possíveis mecanismos que poderiam explicar as lesões causadas pelo ruído ao órgão de Corti de humanos, preferencialmente na região das frequências entre 3.000 e 6.000 Hz. Esses mecanismos incluem: insuficiência vascular na região coclear responsável pela audição destas frequências, aumento na amplitude de deslocamento da onda sonora em alta velocidade no ducto coclear justamente nesta região frequencial, posição das células responsivas por estas frequências na primeira curva do ducto coclear permitindo a colisão do fluido contra estas células e as características de ressonância do canal auditivo humano favorecendo lesões nesta região específica. Todos esses possíveis mecanismos são determinados direta ou indiretamente pela anatomia da orelha humana. Em relação a isso, sabe-se que o número de espiras ou voltas da cóclea varia entre as espécies. Em seu trabalho, Albuquerque et al. (2009) observaram que diferentemente da cóclea humana que possui 2,75 voltas, a cóclea do rato possui 2,5 voltas. Assim, podemos supor que em outras espécies, como o rato, a frequência de 6.000Hz não seja tão suscetível a danos ocasionados pelo ruído em fases iniciais e que o tempo de depleção dopaminérgica não foi suficiente para que o ruído atingisse as células responsivas por essa frequência. Entretanto, outros estudos se fazem necessários para determinar esses efeitos.

7. CONCLUSÃO

Alterações nociceptivas precedem as alterações motoras, enquanto a força permanece inalterada no modelo progressivo de parkinsonismo induzido por repetidas e baixas doses de RES. As alterações nociceptivas decorrentes de estímulo químico relacionam-se com um aumento na atividade de células em três regiões da via modulatória da dor (PAG, RVM e NDR), sugerindo que os indivíduos com Parkinson apresentam diferenças relevantes na atividade celular dessa via. Estes dados reforçam a ideia de que, possivelmente, as alterações nociceptivas sejam um dos sinais precoces da DP e outros estudos são necessários para elucidar quais são os mecanismos neuroquímicos envolvidos nessas alterações.

Além disso, animais com parkinsonismo induzido pelo tratamento crônico com a RES, mostraram-se mais suscetíveis ao ruído, sugerindo que, possivelmente, indivíduos com Parkinson sejam mais predispostos a desenvolver alterações auditivas por exposição aos ruídos ambientais, inclusive em fase pré-motora da doença.

REFERÊNCIAS

ABÍLIO, V. C. et al. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, p.109-114, 2003.

ABILIO, V. C. et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v.47, p. 263-272, 2004.

ALBUQUERQUE, A. A. S. et al. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 1, p. 43-9, 2009.

ALMEIDA, E. O. C. de; NISHIMORI, A. Yumi. Influência do posicionamento do fone na audiometria de alta freqüência. **Rev. bras. otorrinolaringol**, v. 72, n. 5, p. 691-698, 2006.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, p. 40-56, 2004.

ARAÚJO, S. A. Perda auditiva induzida pelo ruído em trabalhadores de metalúrgica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 1, p. 47-52, 2002.

ARORA, V. et al. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain–depression dyad: Behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 10, p. 1570-1581, 2011.

AZEVEDO, M. F. Emissões otoacústicas. In: FIGUEIREDO, M. S. (org.). **Conhecimentos essenciais para entender bem: emissões otoacústicas e BERA.** São José dos Campos: Pulso, p. 35-83, 2003.

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonims and parkinson´s disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (The Bambuí Study). **Moviment Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800-808, 2006.

BARBOSA, E. R.; SALLEM, F. A. S. Doença de Parkinson: diagnóstico. **Rev Neurociênc**, v.13, n.3, p.158-65, 2005.

BARKER, R.A. The basal ganglia and pain. **Int. J. Neurosc.** v. 41, n. 1-2, p. 29-34, 1988.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents.**Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annals of neurology**, v. 4, n. 5, p. 451-462, 1978.

BEISKE A. et al. Pain in Parkinson's disease: prevalence and characteristics. **Pain**, v. 141, p. 173-177, 2009.

BEZARD, E.; PRZEDBORSKI, S. A tale on animal models of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 993-1002, 2011.

BONALDI, L. V. Sistema auditivo periférico. In: BEVILACQUA, M. C., et al. **Tratado de Audiologia**. São Paulo: SANTOS, Cap. 1, p. 3-15, 2011.

BONNET A. M., et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: Relevant clinical aspects. **Parkinson's Disease**, p. 2-15, 2012.

BOGER, M. E.; BARBOSA-BRANCO, A.; OTTONI, A. C. A influência do espectro de ruído na prevalência de Perda Auditiva Induzida por Ruído em trabalhadores. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 3, p. 328-334, 2009.

BOVÉ, J. et al. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. **NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, p. 484 – 494, 2005.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Journal of neurology,** v. 247, n. 2, p. II3-II10, 2000.

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

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.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. **Experimental neurology**, v. 212, n. 1, p. 226-229, 2008.

BRASIL. Terapêuticas, Protocolo clínico e diretrizes; de Parkinson, doença. Portaria nº 228, de 10 de maio de 2010.

BREUEL, M. L. F.; SANCHEZ, T. G.; BENTO, R. F. Vias auditivas eferentes e seu papel no sistema auditivo. **Arq Int Otorrinolaringol**, v. 5, n. 2, p. 149, 2001.

BRONNICK, K. et al. Attentional deficits affect activities of daily living in dementia associated with Parkinson's disease. **J. Neurol Neurosurg. Psychiatry**, v. 77, p. 1136-1142, 2006.

CAMARGOS S., et al. Doença de Parkinson. In: **Manual para diagnóstico de Distúrbios do Movimento**. 1. ed. São Paulo: Omnifarma, 2012, p.35-39.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. O. R. 3, 4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**. v. 180, p. 1200, 1957.

CARVALHO, R. C. et al. Effects of reserpine on the plus-maze discriminative avoidance task: dissociation between memory and motor impairments. **Brain Research**, v. 1122, p. 176–83, 2006.

CASH, R. et al. Adrenergic receptors in Parkinson's disease. **Brain research**, v. 322, n. 2, p. 269-275, 1984.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **The Lancet Neurology**, v. 5, p. 235-245, 2006.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A.H.V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464-474, 2009.

CHEN, S. Y.; TSAI, S. T. The Epidemiology of Parkinson's Disease. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 22, n. 2, p. 73-81, 2010.

CHUDLER, E. H.; DONG, W. K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. **Pain**, v.60, n.1, p. 3-38, 1995.

CHUDLER, E. H.; LU, Y. Nociceptive behavioral responses to chemical, thermal and mechanical stimulation after unilateral, intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine. **Brain research**, v. 1213, p. 41-47, 2008.

CHUDLER, E. H.; SUGIYAMA, K.; DONG, W. K. Nociceptive responses in the neostriatum and globus pallidus of the anesthetized rat. **Journal of neurophysiology**, v. 69, n. 6, p. 1890-1903, 1993.

COIZET, V. et al. The parabrachial nucleus is a critical link in the transmission of short latency nociceptive information to midbrain dopaminergic neurons. **Neuroscience**, v. 168, n. 1, p. 263-272, 2010.

COLPAERT, F. C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1431-1440, 1987.

CORCOS, D. M. et al. Strength in Parkinson's disease: relationship to rate of force generation and clinical status. **Ann Neurol**. v. 39, p. 79-88, 1996.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **J Pain**, v. 1, p. 35-44, 2000.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAWSON, T. M.; KO, H. S.; DAWSON, V. L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron**, v. 66, n. 5, p. 646-661, 2010.

DEFAZIO, G. et al. Pain as a nonmotor symptom of Parkinson disease: evidence from a case-control study. **Archives of neurology**, v.65, n.9, p.1191-1194, 2008.

DE LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 525-535, 2006.

DE LEONIBUS, A. et al. Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. **Psychopharmacology**, v. 194, n. 4, p. 517-525, 2007.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: Besson, A. (Org.). **The pharmacology of pain**. Berlim: Springer-Verlag, p. 21-41, 1997.

DJALDETTI, R. et al. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. **Neurology**, v. 62, p. 2171-2175, 2004.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

DURANTE, A. S. Emissões otoacústicas. In: BEVILACQUA, M. C., et al. **Tratado de Audiologia**. São Paulo: SANTOS, Cap. 10, p. 144-57, 2011.

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, p. 1357–1391, 2011.

EEDEN, K. V. D. S. et al. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology, U.S.A.**, v. 157, n. 11, p. 1015-1022, 2003.

FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. Aging and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain.** v. 114, p. 2283-2301, 1991.

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 & Biological Psychiatry**, v. 32, 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. 16, n. 231(1), p. 154-63, 2012.

FLÓREZ J. Terapéutica Farmacológica del dolor. In: Flórez J (Org.). ***Dolor*: mecanismos de transmission y control**. Madrid, p. 19-39, 1993.

FORD B. Pain in Parkinson's disease. **Clin Neurosci**, v. 5, p. 63–72, 1998.

FRAZZITTA, G. et al. Differences in muscle strength in parkinsonian patients affected on the right and left side. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0121251-e0121251, 2014.

GALEA, J. M., et al. Action reprogramming in Parkinson's disease: response to prediction error is modulated by levels of dopamine**.** ***The Journal of neuroscience***, v. 32, n. 2, p. 542-550, 2012.

GALVAN, A.; DEVERGNAS, A.; WICHMAN, T. Alterations in Neuronal Activity in Basal Ganglia-Thalamocortical Circuits in the Parkinsonian State. **Frontiers in Neuroanatomy,** v. 9 n. 5, p. 1-21, 2015.

GARCIA-RUIZ, P. J.; CHAUDHURI, K.; MARTINEZ-MARTIN, P. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: A review… from the past. **Journal of the neurological sciences**, v.338, n.1, p.30-33, 2014.

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

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, p. 532-545, 2015.

GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. **Pain Physician**, v. 8, p. 277-290, 2005.

GOBBI, L. T. B. et al. Núcleos da base e controle locomotor: aspectos neurofisiológicos e evidências experimentais. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 20, p. 97-101, 2006.

GUEHL, D. et al. Auditory temporal processing in Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, p. 2326–2335, 2008.

HANAGASI, H. A., et al. Pain is common in Parkinson's disease. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 113, n. 1, p. 11-13, 2011.

HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 214-225, 2009.

HIGGINSON, C. I. et al. Recognition memory in Parkinson's disease with and without dementia: evidence inconsistent with the retrieval deficit hypothesis. **J Clin Exp Neuropsychol**, v. 27, n. 4, p. 516-528, 2005.

HORNYKIEWICZ, O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, n. 2 (2), p. S2-S9, 1998.

HUOT, P.; FOX, S. H. The serotonergic system in motor and non-motor manifestations of Parkinson's disease. **Experimental brain research**, v. 230, n. 4, p. 463-476, 2013.

HUTTER-SAUNDERS, J. A. L.; GENDELMAN, H. E.; MOSLEY, R. L. Murine motor and behavior functional evaluations for acute 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 279-288, 2012.

HUGHES, A. J. et al. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study**. Neurology**, v. 42, p. 1142–6, 1992.

HUGHES, A. J. et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 55, n. 3, p. 181-184, 1992.

INZELBERG, R.; KIPERVASSER, S.; KORCZYN, A. D. Auditory hallucinations in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, p. 533-535, 1997.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KALAITZAKIS, M. E., et al. Controversies over the staging of α-synuclein pathology in Parkinson's disease. **Acta neuropathologica**, v. 116, n. 1, p. 125-128, 2008.

KALIA, L. V. et al. α-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. **Annals of neurology**, v. 73, n. 2, p. 155-169, 2013.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. A audição - **Princípios da Neurociência** - 4ª edição. 2003.

KANEKO, K. et al. The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. **Neuroscience letters**, v. 562, p. 28-33, 2014.

KEMPSTER P. A. et al. Asymmetry of substantia nigra neuronal loss in Parkinson's disease and its relevance to the mechanism of levodopa related motor fluctuations. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 52, p. 72-76, 1989.

KHANDHAR, S. M.; MARKS, W. J. Epidemiology of Parkinson's disease. **Disease-A-Month**, v. 53, n. 4, p. 200-205, 2007.

LANA, R. C. et al. Percepção da Qualidade de Vida de indivíduos com doença de Parkinson através do PDQ-39. **Rev Bras Fisioterapia**, São Carlos, v. 11, n. 5, p. 397-402, 2007.

LANG, A. E. A critical appraisal of the premotor symptoms of Parkinson's disease: potential usefulness in early diagnosis and design of neuroprotective trials. **Movement Disorders**, v. 26, n. 5, p. 775-783, 2011.

LAI, S.-W. et al. Hearing loss may be a non-motor feature of Parkinson's disease in older people in Taiwan. **European Journal of Neurology**, v. 21, n. 5, p. 752-757, 2014.

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**, 2015.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, M. A. et al. A survey of pain in idiopathic Parkinson's disease. **J Pain Symptom Manage**, v. 32, p. 462-469, 2006.

LEES, A. J.; HARDY, J; REVEZ, T. Parkinson's disease. **Lancet,** v. 373, p. 2055–66, 2009.

LEWALD, J.; SCHIRM, S. N.; SCHWARZC, M. The perception of speech intensity in parkinson's disease. **Cognitive Brain Research**, v. 21, p. 335-41, 2004.

LIMONGI, J. C. P. **Conhecendo melhor a Doença de Parkinson –** uma abordagem multidisciplinar com orientações práticas para o dia-a-dia. São Paulo: Plexius, 2001.

LIDSKY, T. I.; MANETTO, C.; SCHNEIDER, J. S. A consideration of sensory factors involved in motor functions of the basal ganglia. **Brain Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 133-146, 1985.

LIM, D. J.; DUNN, D. E. Anatomic correlates of noise induced hearing loss. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 12, n. 3, p. 493, 1979.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. ***Lancet***, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOHR, J. B., KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A. B. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs**, v. 17, n. 1, p. 47–62, 2003.

LUIZ, A. P. et al. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of Humirianthera ampla Miers. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 355-363, 2007.

MAGNUSSON, J. E.; FISHER, K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D 1 and D 2 receptors in the dorsolateral striatum. **Brain research**, v. 855, n. 2, p. 260-266, 2000.

MAISON, S. F. et al. Dopaminergic signaling in the cochlea: receptor expression patterns and deletion phenotypes, **J Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 344-55, 2012.

MARSDEN, C. D. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 335, p. 948-952, 1990.

MARTIN, G. K. et al. Characterizing distortion-product otoacoustic emission components across four species. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 129, n. 5, p. 3090-3103, 2011.

McDONALD, W. M.; RICHARD, I.H.; DELONG, M.R. Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 363-375, 2003.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P.K.; CHESSELET, M.F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathologica**, v. 115, p. 385-398, 2008.

MEYER, O. A. et al. A method for the routine assessment of fore-and hindlimb grip strength of rats and mice. **Neurobehavioral toxicology**, v. 1, n. 3, p. 233-236, 1978.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobioly**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MIRANDA, E. S. et al. Avaliação do processamento auditivo de sons não-verbais em indivíduos com doença de Parkinson. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, vol. 70, n. 4, p. 534-539, 2004.

MOMENSOHN-SANTOS, T. M. M. et al. Determinação dos limiares tonais por via aérea e por via óssea. **Momensohn-Santos TMM, Russo ICP, organizadoras. Prática da audiologia clínica**, v. 4, p. 67-96, 2005.

MORRISH, P. K., et al. Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F] dopa PET. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v.64, n.3, p.314-319, 1998.

MULLA, S. M. et al. Management of chronic neuropathic pain: a protocol for a multiple treatment comparison meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ Open 2014**, v. 4, n. 11, p. e006112, 2014.

NAGAKURA, Y. et al. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: a putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146, n. 1, p. 26-33, 2009.

NAGAKURA, Y. et al. Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. **Behavioural brain research**, v. 226, n. 1, p. 242-249, 2012.

NASCIMENTO, S. S. et al. Cyclodextrin-Complexed Ocimum basilicum Leaves Essential Oil Increases Fos Protein Expression in the Central Nervous System and Produce an Antihyperalgesic Effect in Animal Models for Fibromyalgia. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 547-563, 2014.

NÈGRE-PAGÈS, L. et al. Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectionnal DoPaMiP study. **Mov. Disord.,** v. 25, n. 2, p. 157-166, 2010.

NETO, Onofre Alves. **Dor: princípios e prática**. Artmed, 2009.

OBESO, J. A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle**. Nature medicine**, v.16, n.6, 2010.

OE, T.; TSUKAMOTO, M.; NAGAKURA, Y. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. **Neuroscience**, v. 169, n. 4, p. 1860-1871, 2010.

OGATA, M. et al. Characterization of nociceptive response to chemical, mechanical, and thermal stimuli in adolescent rats with neonatal dopamine depletion. **Neuroscience**, p. 43-55, 2015.

OLIVERAS, J. L. et al. A map of serotoninergic structures involved in stimulation producing analgesia in unrestrained freely moving cats. **Brain Research**, v. 164, n. 1, p. 317-322, 1979.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779, 2010.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. J **Neuropsychiatry Clin Neurosci,** v.14, p. 223-236, 2002.

PAULSON H. L.; STERN, B. M. Clinical Manifestations of Parkinson's Disease. In Watts RL, Koller WC. **Movement Disorders Neurologic Principles and Practice**. New York: MacGraw, p. 233-246, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates-The New Coronal Set,** Sixth ed. Academic press, 2007.

PEREIRA, D.; GARRETT, C. Factores de risco da doença de Parkinson: um estudo epidemiológico. **Acta Médica Portuguesa**, v.23, n.1, p.15-24, 2010.

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science,** v. 274, n. 5290, p. 1197-1199, 1996.

PONSEN, Mirthe M., et al. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 56, n.2, p. 173-181, 2004.

POSTUMA, R. B.; GAGNON, J. F.; MONTPLAISIR, J. Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.81, p.1008–1013, 2010.

QUAGLIATO, L. B. et al. Alterações do olfato na doença de Parkinson. **Arq Neuropsiquiatr**, Sorocaba, 65 (3A), 2007. 647-652.

QING-PING, W.; NAKAI, Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. **Brain research bulletin**, v. 34, n. 6, p. 575-585, 1994.

QUINN, N. et al. Painful Parkinson's disease. **Lancet**, v.1, p.1366-1369, 1986.

QUITTENBAUM, B. H.; GRAHN, B. Quality of life and pain in parkinson's disease: a controlled cross-sectional study. **Parkinsonism relat disord**, v.10, p.129–136, 2004.

RABELO, A. S. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from Remirea maritima (Cyperaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 11-17, 2013.

RANA, A. Q. et al. A cross-sectional study investigating clinical predictors and physical experiences of pain in Parkinson's disease. **Funct. Neurol**., v.*28*, p.1–8, 2013.

REDGRAVE, P. et al. Nociceptive neurones in rat superior colliculus. **Experimental brain research**, v. 109, n. 2, p. 197-208, 1996.

REYES, S.; MITROFANIS, J. Patterns of FOS expression in the spinal cord and periaqueductal grey matter of 6OHDA-lesioned rats. **International Journal of Neuroscience**, v. 118, n. 8, p. 1053-1079, 2008.

RICHARDS, C. D.; TAYLOR, D. C. M. Electrophysiological evidence for a somatotopic sensory projection to the striatum of the rat. **Neuroscience letters**, v.30, n.3, p.235-240, 1982.

RUEL, J. et al. Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. **Eur J Neurosci**. v. 14, p. 977–986, 2001.

SAADÉ, N. E. et al. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. **Brain research**, v. 751, n. 1, p. 1-12, 1997.

SAHLEY, T. L.; NODAR, R.H.; MUSIEK, F.E. **Efferent auditory system: structure and function**. Singular publishing group, 1997.

SANTOS, J. R. **Estudo das alterações cognitivas, motoras e neuroquímicas em dois novos modelos progressivos da doença de parkinson**. 2012.160f. Tese (Doutorado em Psicobiologia)- Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

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.

SCHAPIRA, A. H. The use of rasagiline in parkinson's disease. **J. Neural Transm. Suppl**., v.71, p.157-161, 2006.

SCHESTATSKY, P. et al. Promising treatments for neuropathic pain. A**rquivos de Neuro-psiquiatria**, v.72, n.11, p.881-888, 2014.

SCHLOSSMACHER, M. G.; MOLLENHAUER, B. Biomarker research in Parkinson's disease: objective measures needed for patient stratification in future cause-directed trials. **Biomarkers in Medicine**, Otawa, v.4, p.647-650, 2010.

SCHULZ, J. B.; FALKENBURGER, B. H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell and Tissue Research**, v. 318, p.135-147, 2004.

SHARMA, S. et al. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). **Neurochemistry International**, Bonaire, v.63, p.201-229, 2013

SHARMA, N.; RANA, A. C.; BAFAN, P. Effect of aqueous extract of cynodondactylon on reserpine induced catalepsy. **Int J Pharm Pharm Sci**, v.3, n.4, p.424-426, 2011.

SHYU, B. C. et al. Neurophysiological, pharmacological and behavioral evidence for medial thalamic mediation of cocaine-induced dopaminergic analgesia. **Brain research**, v. 572, n. 1, p. 216-223, 1992.

SILVA, R. H. et al. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behavioural brain research**, v. 132, n. 2, p. 171-177, 2002.

SOMMER, U. et al. Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. **Movement disorders**, v. 19, n. 10, p. 1196-1202, 2004.

SOUQUES, M. A. Des douleurs dans la paralysie agitante. **Rev Neurol**, v.37, p.629-633, 1921.

SOUSA, F. A. E. F. Dor: o quinto sinal vital. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v.10, p. 446-447, 2002.

STANDAERT, D.; GALANTER, J.M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In: **Princípios de Farmacologia: a Base Fisiopatologia da Farmacoterapia**, p.166-185, 2009.

STIASNY-KOLSTER, K. et al. Combination of 'idiopathic' REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. **Brain**, v. 28, p. 126–37, 2005.

SUFKA, K. J. et al. Scoring the mouse formalin test: validation study. **European Journal of Pain**, v. 2, n. 4, p. 351-358, 1998.

SZABADI, E. Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus. **Frontiers in integrative neuroscience**, n. 6, 2012.

TAKEDA, R. et al. Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation. **Neuroscience research**, v. 52, n. 1, p. 31-36, 2005.

TANNER C. M.; ASTON D. A. Epidemiology of Parkinson´s Disease and akinetic syndromes. Curr.Opin. **Neurol.** v.13, n.4, p.427-30, 2000.

TASSORELLI, C. et al. Behavioral responses and Fos activation following painful stimuli in a rodent model of Parkinson's disease. **Brain research**, v. 1176, p. 53-61, 2007.

TAVERNA, S.; ILIJIC, E.; SURMEIER, D. James. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. **The Journal of neuroscience**, v. 28, n. 21, p. 5504-5512, 2008.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da doença de Parkinson. **Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 33-37, 2005.

TISSINGH G. et al. Drug-naive patients with Parkinson’s disease in Hoehn and Yahr stages I and II show a bilateral decrease in striatal dopamine transporters as revealed by [123I]-CIT SPECT. **J Neurol**. v. 245, p.14 –20, 1998.

TOLOSA, E.; COMPTA, Y.; GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v.13, p.S2-S7, 2007.

TOLOSA, E.; PONT-SUNYER, C. Progress in defining the premotor phase of Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 310, n. 1, p. 4-8, 2011.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TRUINI, A.; FRONTONI, M.; CRUCCU, G. Parkinson's disease related pain: a review of recent findings. **Journal of neurology**, v.260, n.1, p.330-334, 2013.

URAKAMI, K. et al. The threshold of pain and neurotransmitter's change on pain in Parkinson's disease. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 44, n. 3, p. 589-593, 1990.

VILLALBA, R. M.; LEE, H.; SMITH, Y. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. **Experimental neurology**, v. 215, n.2, p. 220-227, 2009.

VITALE, C. et al. Hearing impairment in Parkinson's disease: Expanding the nonmotor phenotype. **Movement Disorders**, v. 27, n. 12, p. 1530-1535, 2012.

VON FREY M., UEBER D. G. V. R. in: Untersuchungen uèber die sinnesfunctionen der mensch-lichen Haut. Erste Abhandlung: druckempfindung undschmerz. Abhandlungen der mathematisch-physischen classe der koèniglich saèchsischen gesellschaftder wissenschaften. v. 23, p. 208±217, 1896.

VOON, V.; FOX, S. H. Medication-related impulse control and repetitive behaviors in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v.64, n.8, p.1089-1096, 2007.

WALL, P. D. On the relation of injury to pain the John J. Bonica Lecture. **Pain**, v.6, n.3, p. 253-264, 1979.

WANG, J. et al. MRI evaluation of asymmetry of nigrostriatal damage in the early stage of early-onset Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, 2015.

WASNER, G.; DEUSCHL, G. Pains in Parkinson disease – many syndromes under one umbrella. **Nat Rev Neurol**, v.17, n.8, p.284–294, 2012.

WOOD, H. Parkinson disease: Proteomic tools identify dementia biomarkers in PD. **Nat Rev Neurol**, v.8, n.4, 2012.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, p.1765-1769, 2000.

YýLMAZ, S. et al. Auditory evaluation in Parkinsonian patients. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.266, p.669–671, 2009.

ZEIGELBOIM, B. S. et al. Avaliação do Processamento Auditivo Central em Pacientes. **Arq. Int. Otorrinolaringol**, v.15, n.2, p.189-194, 2011.

ZHANG, R. X.; REN, K. Animal models of inflammatory pain. In: **Animal Models of Pain**. Humana Press, v. 49, p. 23-40, 2011.

ANEXOS

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

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **"NOCICEPÇÃO E FUNÇÕES AUDITIVA E OLFATIVA EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA PARKINSON" Sob Coordenação do Prof. Dr. Murilo Marchioro** (protocolo **CEPA 36/2014**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 31/03/2015.

São Cristóvão, 09 de abril de 2015.

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

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