



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

CLARISSA GOMES ANDRADE ALVAIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CLORIDRATO DE
FLUOXETINA EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA**

**SÃO CRISTÓVÃO
2017**

CLARISSA GOMES ANDRADE ALVAIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CLORIDRATO DE
FLUOXETINA EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA**

Texto de dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

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

**SÃO CRISTÓVÃO
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

A472e Alvaia, Clarissa Gomes Andrade
 Efeito da administração de cloridrato de fluoxetina em ratos
 submetidos a um modelo de parkinsonismo induzido por reserpina
 / Clarissa Gomes Andrade Alvaia ; orientador Murilo Marchioro. –
 São Cristóvão, 2017.
 75 f. : il.

 Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
 Universidade Federal de Sergipe, 2017.

 1. Distúrbios do movimento. 2. Tremor (Medicina). 3. Inibidores
 enzimáticos. 4. Parkinson, Doença de. 5. Reserpina. 6. Fluoxetina. I.
 Marchioro, Murilo, orient. II. Título.

CDU 612.015:616.858-085

CLARISSA GOMES ANDRADE ALVAIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CLORIDRATO DE
FLUOXETINA EM UM MODELO DE PARKINSONISMO
INDUZIDO POR RESERPINA**

Texto de dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

1º Examinador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

2º Examinador: Prof. Dr. Luís Felipe Souza da Silva

3º Examinador: Prof^a Dr^a Alessandra Mussi Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Eu sou muitíssimo grata a Deus por muitos presentes recebidos ao longo da minha vida, nenhum deles por merecimento meu, apenas por sua graça. Um desses presentes é a minha família, meus pais, que nunca mediram esforços para garantir tudo o que eu precisasse e ainda mais. E foi graças a vocês, sr José Cecílio e dona Valquíria, que eu pude chegar aqui. Devo tudo a vocês. Também às minhas irmãs Cínthia e Cecília pelo apoio de sempre. A meu esposo, Rodrigo, pelo amor, pela paciência e pela compreensão nesses momentos difíceis.

A Kelly Coutinho, minha querida amiga, que sempre esteve do meu lado me apoiando, me auxiliando a superar os obstáculos e me emprestando o ombro.

Aos meus laboratórios, LNFS e LANCE. Eu tive muita sorte por participar desse grupo. A Marcos Menezes, por sempre estar disposto a me ajudar e por me receber tão bem. A Pollyana, por me ajudar nos primeiros passos e nos últimos também. A João, por estar em todos os experimentos me dando suporte, Auderlan pela disposição e pela ajuda. Edson Lima e Edson Rezende, obrigada pelo trabalho nas imunos.

Agradeço ao professor Murilo Marchioro, por se dispor a me aceitar, apesar de eu ter chegado com pouco tempo para realização de um novo projeto, por aceitar uma aluna com disponibilidade limitada e sem me conhecer bem. Obrigada pela confiança.

Ao professor José Ronaldo, por todo o apoio, por compartilhar do seu conhecimento comigo, pela paciência em me ensinar as muitas coisas que eu ainda não sabia, e por me orientar em tudo. O senhor fez muito mais do que deveria por mim. Eu o admiro muito.

Ao LAFICO, por me conceder sua estrutura para várias etapas do meu trabalho.

À UFS, minha casa desde a graduação, ao PROCFIS, aos professores Daniel Badauê, Luis Felipe, Enilton Camargo, Hector Julian, Vanessa Tortelli e, antecipadamente, à prof.^a Alessandra Mussi. Também ao nosso secretário Renivan, sempre disposto a ajudar.

RESUMO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CLORIDRATO DE FLUOXETINA EM UM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA, Clarissa Gomes Andrade Alvaia, São Cristóvão, 2017.

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem motora mais comum e também é considerada uma doença progressiva multissistêmica ligada a vários sintomas não motores (SNM), como a depressão, que acomete cerca de 50% dos pacientes. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são considerados os principais medicamentos para o tratamento desse SNM, embora pesquisas que utilizaram indução aguda de parkinsonismo tenham relacionado a fluoxetina ao agravamento dos sintomas motores. Diante disso, este estudo objetivou avaliar o efeito da administração de cloridrato de fluoxetina em um modelo de parkinsonismo induzido por baixas doses de reserpina. Foram utilizados 64 ratos Wistar, machos, com idade de 7 a 9 meses, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: veículo fluoxetina + veículo reserpina (CTR); fluoxetina 10 mg/kg + veículo reserpina (F); fluoxetina 10 mg/kg + reserpina 0,1 mg/kg (F + R); e veículo fluoxetina + reserpina 0,1 mg/kg (R). Durante o tratamento, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, catalepsia e avaliação dos movimentos orofaciais. Foi observado aumento da latência na barra, diminuição da distância total percorrida em campo aberto, diminuição do número de rearing, aumento dos movimentos involuntários de mandíbula e maior alteração de peso corporal dos animais do grupo F + R. O tratamento apenas com fluoxetina provocou alterações imunohistoquímicas, como a diminuição da expressão de TH no estriado dorsal e aumento da marcação para 5-HT no núcleo dorsal da rafe, sem correlação com nenhum sintoma motor para esse grupo. O grupo F + R apresentou resultados de imunorreatividade distintos para as administrações breve e continuada.

Palavras-chave: Discinesia; Tremor; Depressão; Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina.

ABSTRACT**EFFECT OF FLUOXETINE HYDROCHLORIDE ON A MODEL OF PARKINSONISM INDUCED BY RESERPINE, Clarissa Gomes Andrade Alvaia, São Cristóvão, 2017.**

Parkinson's Disease is the second most common motor disorder and is also considered a progressive multisystemic disease associated to several non-motor symptoms (NMS), such as depression, with a prevalence of about 50% among PD patients. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) are the main treatment for this NMS, although researches with acutely induced parkinsonism has related fluoxetine to increased motor impairment. The aim of the present research is to evaluate the effect of the fluoxetine hydrochloride on a model of parkinsonism induced by low doses of reserpine. Sixty-four male 7-9-month-old Wistar rats were used, and were obtained from vivarium of the Department of Physiology – Federal University of Sergipe. Animals were divided into four groups: fluoxetine vehicle + reserpine vehicle (CTR); fluoxetine 10 mg/kg + reserpine vehicle (F); fluoxetine 10 mg/kg + reserpine 0,1 mg/kg (F + R); and fluoxetine vehicle + reserpine 0,1 mg/kg (R). During the treatment, the animals were submitted to open field test, catalepsy test and tremulous jaw movement evaluation. It was shown that animals treated with fluoxetine and reserpine spent more time at the catalepsy test, decreased distance travelled, lower number of rearing at the open field test, increased tremulous jaw movements and increased weight loss. The treatment only with fluoxetine caused immunohistochemistry changes, such as decrease of TH expression in the dorsal striatum and increased staining of the dorsal raphe nucleus, with no correlation with MS for this group. The F + R group showed different immunohistochemistry results for both acute and continued administrations.

Key-words: Diskinesia; Tremor; Depression; Selective Serotonin Reuptake Inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração dos gânglios da base e modulação dopaminérgica dos movimentos voluntários...	19
Figura 2: Representação esquemática do efeito de fármacos utilizados na indução de parkinsonismo na transmissão monoaminérgica	22
Figura 3: Ilustração esquemática do experimento 1.....	27
Figura 4: Ilustração esquemática do experimento 2.....	28
Figura 5: Teste de catalepsia.	29
Figura 6: Teste de campo aberto.	30
Figura 7: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre o comportamento de catalepsia em animais submetidos à indução de parkinsonismo com 4 doses de reserpina (0,1 mg/kg).....	35
Figura 8: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre a distância percorrida e número de rearing após indução de parkinsonismo com 4 doses de reserpina (0,1 mg/kg).....	36
Figura 9: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre a exploração do centro do campo aberto dos animais tratados com reserpina (0,1 mg/kg).....	37
Figura 10: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) ou veículo sobre os movimentos orofaciais.....	38
Figura 11: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre a variação de peso dos animais com parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).....	39
Figura 12: Efeito da administração de fluoxetina (10 mg/kg) na D.O.R de VTA e SNpc de animais submetidos a parkinsonismo.....	40
Figura 13: Efeito da administração repetida de Fluoxetina (10mg/kg) em animais com parkinsonismo na expressão de TH do ESTd.....	40
Figura 14: Imagens representativas da ação da administração precoce de fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para TH em VTA, SNpc e ESTd.....	41
Figura 15: Efeito da administração precoce de fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para 5-HT de animais submetidos a parkinsonismo.....	41
Figura 16: Imagens representativas da administração precoce de fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para 5-HT de animais submetidos a parkinsonismo.....	42
Figura 17: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre o comportamento de catalepsia de animais submetidos à indução de parkinsonismo com doses repetidas de reserpina.....	43
Figura 18: Diferença entre os grupos CTR e R, nas atividades de campo aberto após 4 injeções de reserpina (0,1 mg/kg).....	44
Figura 19: Diminuição da distância total percorrida (m) e número de rearing dos grupos F + R e R na tarefa de campo aberto após 10 injeções de reserpina.....	45

Figura 20: Ação da fluoxetina (10 mg/kg) na exploração da área central do campo aberto observadas após 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg).....	46
Figura 21: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) ou veículo sobre os movimentos orofaciais após a 5ª injeção de reserpina (0,1 mg/kg).....	47
Figura 22: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) ou veículo sobre os movimentos orofaciais após a 9ª injeção de reserpina (0,1 mg/kg).....	48
Figura 23: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) iniciada após 5 injeções de reserpina (0.1mg/kg) sobre a variação de peso dos animais.....	49
Figura 24: Relação entre o número de células TH+ em VTA e a administração de fluoxetina (10mg/kg) em animais com parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).....	50
Figura 25: Efeito da administração de 12 injeções de Fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para TH da SNpc e ESTd de animais com parkinsonismo após 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg).....	50
Figura 26: Imagens representativas da administração de fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para TH de animais tratados com 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg)	51
Figura 27: Alterações na D.O.R do NDR de animais submetidos a parkinsonismo e tratados com 12 injeções de fluoxetina (10 mg/kg).....	52
Figura 28: Imagens representativas do efeito da fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade do NDR de animais submetidos a 4 injeções de reserpina (0,1 mg/kg).....	52

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Doença de Parkinson	17
2.2 Modelo animal de parkinsonismo induzido por baixas doses de reserpina	21
2.3 Sistema serotoninérgico e Doença de Parkinson	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais	26
4.3 Drogas e delineamento experimental.....	26
Figura 3: Ilustração esquemática do experimento 1.	27
Figura 4: Ilustração esquemática do experimento 2.	28
4.4. Testes Comportamentais	28
4.4.1. Teste de Catalepsia	28
Figura 5: Teste de catalepsia. Adaptado de BISPO, 2016.	29
4.4.2. Teste do Campo Aberto	29
Figura 6: Teste de campo aberto.....	30
4.4.3. Avaliação dos movimentos orofaciais	30
4.5 Pesagem	30
4.6 Perfusão dos animais e processamento do cérebro	31
4.7 Imunohistoquímica para Tirosina-Hidroxilase e 5-HT	31
4.8 Aquisição de imagens e contagem de células	32
4.9 Avaliação da Densitometria Óptica Relativa – DOR.....	33
4.10 Análise estatística	33
5. RESULTADOS	35
5.1 Efeito da administração repetida de fluoxetina em estágios iniciais do parkinsonismo induzido por reserpina.....	35

5.1.1 Comportamento de catalepsia	35
5.1.2 Atividade no campo aberto	36
5.1.3 Movimentos orofaciais	37
5.1.4 Variação de peso corporal	38
5.1.5 Imunorreatividade para TH.....	39
5.1.6 Imunorreatividade para Serotonina.....	41
5.2 Efeito da administração repetida de fluoxetina antes das alterações motoras em animais induzidos a parkinsonismo pela reserpina.	42
5.2.1 Comportamento de catalepsia.....	42
5.2.2 Atividade no campo aberto	44
5.2.2.1 Atividade no campo aberto após a 4º injeção de reserpina	44
5.2.2.2 Atividade no campo aberto após a 10ª injeção de reserpina.....	45
5.2.3 Movimentos Orofaciais	46
5.2.4 Variação de peso corporal	48
5.2.5 Imunorreatividade para TH.....	49
5.2.6 Imunorreatividade para Serotonina.....	51
6. DISCUSSÃO	53
6.1 Prejuízo motor na catalepsia.....	53
6.2 Redução da atividade espontânea no campo aberto	55
6.3 Aumento do tremor oral e dos movimentos orofaciais	58
6.4 Redução de peso corporal.....	59
6.5 Alterações imunohistoquímicas para TH e 5-HT.....	61
7. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina
6OHDA – 6-hidroxidopamina
AADC – Aminoácido aromático descarboxilase
ANOVA – Análise de variância
CTR – Grupo controle
DA – Dopamina
DAT – Transportador de dopamina
DDCI – Inibidor da DOPA descarboxilase
DP – Doença de Parkinson
E.P.M – Erro padrão da média
ESTd – Estriado dorsal
F – Fluoxetina
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GPe – Globo pálido externo
GPi – Globo pálido interno
HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
i.p – Intraperitoneal
LC – Locus Ceruleus
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NM – Neuromelanina
NDR – Núcleo dorsal da rafe
PET – Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PFA - Paraformaldeído
PB – Tampão fosfato
PBS – Tampão fosfato salina
R – Reserpina
SM – Sinais motores

SNM – Sinais não motores

SNpc – Substância negra parte compacta

SNpr – Substância negra parte reticulada

TH – Tirosina hidroxilase

VMAT – Transportador vesicular de monoaminas

VTa – Área tegmental ventral

1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças neurodegenerativas, a Doença de Parkinson (DP) é a segunda mais comum, com uma incidência de 8-18 a cada 100.000 pessoas ao ano, e é relacionada à idade, afetando cerca de 1% das pessoas acima de 60 anos e 4% acima de 80 (WIRDEFELDT *et al.*, 2011). É estimado que cerca de 1 milhão de pessoas sejam acometidas pela DP nos Estados Unidos (LANG; LOZANO, 1998), causando grande gasto econômico (HUSE *et al.*, 2005). É estimado que o número de pessoas acometidas por esta doença chegue a 9.3 milhões nos países mais populosos até o ano de 2030 (DORSEY *et al.*, 2007).

Os sintomas motores (SM) clássicos da DP estão associados à presença de corpos de Lewy e à perda de neurônios dopaminérgicos (GIBB; LEES, 1988). Contudo os sintomas não motores (SNM) como demência (BUTER *et al.*, 2008), prejuízo cognitivo (FOLTYNIE; BRAYNE; BARKER, 2002), alterações no sono (FALUP-PECURARIU, DIACONU, 2017) e depressão (WANG *et al.*, 2017) podem preceder os SM em até uma década (CHAUDHURI; NAIDU, 2008; CHAUDHURI; YATES; MARTINEZ-MARTIN, 2005).

O déficit cognitivo ocorre em estágios iniciais da doença e comumente inclui alteração da memória, função executiva e função visoespacial (LITVAN *et al.*, 2011). A demência acomete aproximadamente 80% dos pacientes de DP num período de 8 anos, o que causa grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e cuidadores e está relacionada ao aumento da mortalidade (PIROGOVSKY-TURK *et al.*, 2016).

Embora não tenha uma causa evidente, há fatores de risco associados, principalmente o envelhecimento (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2017). Além disso, há referências de que disfunções mitocondriais (SHAPIRA *et al.*, 1990), neuroinflamação (CHEN; ZANG; HUANG, 2016) e o estresse oxidativo (BLESA *et al.*, 2015) tenham papel importante no desenvolvimento da doença, apesar de os mecanismos precisos pelos quais a DP se desenvolve ainda não estejam bem esclarecidos.

O diagnóstico da DP em muitos casos pode ser de difícil conclusão, pois tanto os pacientes quanto os médicos podem ter dificuldades em reconhecer alguns dos sintomas, como alterações precoces na marcha – que podem ser sutis e atribuídas ao processo de envelhecimento (BREEN *et al.*, 2013). O critério mais utilizado para diagnóstico da DP é a do Banco de Cérebro da Sociedade de Parkinson do Reino Unido (da sigla em inglês UKPDSBB), sendo o principal sintoma a bradicinesia, associada a outros fatores.

Os sinais cardinais da doença são bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade postural (JANKOVIC, 2008). Parte desses sintomas motores da DP, particularmente a bradicinesia e rigidez, ocorrem devido à perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, com consequente diminuição da DA na substância negra e no estriado (FAHN, 2003).

Essa degeneração dopaminérgica na DP está relacionada com inclusões de α -sinucleína, conhecidas como corpúsculos de Lewy (BRAAK *et al.*, 2003). Não apenas resultante de alterações dopaminérgicas, são observadas essas inclusões em áreas serotoninérgicas, como nos núcleos da rafe (SEIDEL *et al.*, 2015). Ainda, foi observada relação direta entre a fadiga e a depressão em pacientes com DP, e que este último sintoma está negativamente correlacionado aos níveis de 5-HT no líquido cefalorraquidiano (ZUO *et al.*, 2016).

Ainda em relação à depressão na DP, uma pesquisa analisou estudos de 1922 a 1998 e observou que cerca de um terço dos pacientes apresentavam depressão, com sintomas que incluíam apatia, alterações de memória e pensamento suicida (SLAUGHTER *et al.*, 2001).

Para o tratamento desses sintomas de transtornos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são os medicamentos mais prescritos para os pacientes com DP (RICHARD; KURLAN, 1997). No entanto, há evidências de que o uso destes medicamentos está relacionado com aumento da alteração motora nos pacientes de DP e, entre os ISRS, a fluoxetina está indicada como o ISRS responsável por esse agravamento (MORELLI *et al.*, 2011; PODURGIEL *et al.*, 2015).

Em relação a este agravamento dos SM em pacientes com DP devido ao uso de ISRS, até o momento, há disponível na literatura publicações com modelos animais de parkinsonismo, no entanto, são baseados na indução aguda das alterações motoras observadas na DP, impossibilitando a mimetização da característica progressiva da doença. Esses modelos impossibilitam o estudo de SNM que precedem os SM.

Além disso, o envolvimento de outros neurotransmissores na fisiopatologia da Doença de Parkinson, como a serotonina, justifica a pesquisa de outros sistemas, além do dopaminérgico, de forma que se possa modular os diferentes sintomas e efeitos colaterais decorrentes do tratamento da doença.

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo animal capaz de estudar a natureza progressiva da DP, baseado na administração repetida de baixas doses (0,1mg/kg) de reserpina s.c. (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013). Hipotetizamos que a administração de ISRS em estágios iniciais da DP, como forma de

tratamento dos SNM (ansiedade e depressão) causa uma antecipação ou aumento dos SM. No presente estudo, utilizamos o modelo de parkinsonismo crônico, com baixas doses de reserpina, para acompanharmos as alterações comportamentais e neuroquímicas causadas pela administração repetida de fluoxetina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Parkinson

A DP afeta milhões de pessoas em todo o mundo e foi melhor descrita por James Parkinson como paralisia agitante em 1817 em sua publicação “Um ensaio sobre a paralisia agitante” do inglês “*An essay on the shaking palsy*”. Posteriormente, essa doença é chamada de Doença de Parkinson por Charcot, em 1888, como uma homenagem a James Parkinson (PARKINSON, 1817 *apud* PIRES *et al.*, 2017).

É estimado que a DP afete entre 1 e 2 % da população com idade acima de 60 anos (de LAU; BRETELER, 2006). Sua prevalência no Brasil ainda não é conhecida (BRASIL, 2010). Sendo a idade considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento da DP, esta doença assume importantes implicações quanto à saúde pública, uma vez que é observado o envelhecimento populacional e aumento da expectativa de vida (KALIA; LANG, 2015).

Além de afetar um número maior de homens do que mulheres (BREEN *et al.*, 2013), a DP apresenta outras diferenças relativas a gênero: mulheres apresentam idade mais avançada do início dos sintomas, são mais propensas a apresentarem a forma de tremor dominante da doença e apresentam menor disfunção nigroestriatal (HAAXMA *et al.*, 2007). Há também diferenças quanto à apresentação dos sintomas. Um estudo com 948 pacientes com DP constatou que mulheres apresentaram mais depressão e fadiga, enquanto os homens apresentaram mais alterações de marcha (SCOTT *et al.*, 2000). Entre as diferentes etnias, a DP também se apresenta de forma heterogênea, sendo mais comum em hispânicos, seguidos por brancos não-hispânicos, asiáticos e negros (VAN DEN EEDEN *et al.*, 2003).

A DP tem sido há muito tempo considerada uma patologia decorrente da degeneração dopaminérgica na Substância Negra parte compacta (SNpc), que acarreta diminuição da dopamina (DA) no estriado e o surgimento dos principais SM da DP: tremor de repouso, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez (SANDERS; GREENAMYRE, 2013). Ressalta-se que existem outros circuitos neuronais e alterações neuroquímicas consideradas cruciais no desenvolvimento da doença como o serotoninérgico (HUOT *et al.*, 2017), o colinérgico (FUJITA *et al.*, 2005), o canabinóide (PIZANI *et al.*, 2005), o opióide (CHARRON *et al.*, 2011) e o glutamatérgico (CALON *et al.*, 2002).

Além das alterações motoras clássicas observadas no curso da doença, outros sintomas pré-motores também podem ser observados, como alterações no sono, sintomas neuropsiquiátricos, autonômicos, gastrointestinais, sensoriais e outros como fadiga e perda de peso (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

Uma alteração que explica, em parte, a fisiopatologia da DP é a quantidade de neuromelalina (NM), um pigmento escuro que se acumula naturalmente no interior do soma neuronal na SN, na VTA e no LC. É cercada por dupla membrana e sua produção ocorre quando o excesso de catecolaminas é captado para as vesículas pela VMAT2. A NM tem propriedades antioxidantes, ajudando a controlar o estresse oxidativo na célula. Quando ocorre a neurodegeneração da SN, a NM é liberada e fagocitada pela micróglia e a ativação dessas células gera um processo inflamatório que culmina com um ciclo vicioso de neurodegeneração e neuroinflamação. E há indícios da relação direta entre a perda celular na DP e a diminuição de neurônios com NM (MARTIN-BASTIDA; PIETRACUPA; PICCINI, 2016).

Ainda em relação a etiologia das doenças neurodegenerativas, incluindo a DP, a desregulação epigenética parece ter importante contribuição. O termo epigenética se refere a alterações na expressão de genes, normalmente reversível, que podem ser herdadas, mas que não são gravadas na sequência do DNA. Poluentes químicos, nutrição, alterações de temperatura e outros fatores ambientais podem influenciar na expressão de genes via modificações epigenéticas (PAVLOU; OUTEIRO, 2017).

Quanto à fisiopatologia do parkinsonismo, foi observado que seus sintomas são associados a alterações complexas na atividade de projeções estriatais, sendo as projeções para a SNpr e GPi menos ativas e as projeções para o GPe mais ativas (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989). Sendo assim, foi dado início à ideia de que o controle do movimento seria feito por duas vias: a ativação de neurônios com receptores D1 aumenta as respostas corticoestriatais da via direta, enquanto neurônios com receptores D2 diminui essa resposta pela via indireta, sendo o papel da DA de balancear as duas vias (FLORES-BARRERA *et al.*, 2011). A SNpc inerva regiões estriatais que expressam tanto receptores excitatórios D1 quanto os inibitórios D2. A via direta é ativada pela ação da DA nos neurônios que possuem receptores D1, que se projetam para o GPi; enquanto a via indireta é feita pela ação inibitória dos receptores D2 sobre o GPe (BRITAIN; BROWN, 2014). A diminuição das projeções dopaminérgicas para o estriado resulta no estado hipocinético observado na DP (GRAYBIEL,

1996). A interação entre a substância negra e os núcleos da base no controle motor voluntário está esquematizada na figura 1.

Em resposta a essas alterações dopaminérgicas, o tremor é uma das principais características da DP, afetando cerca de 70% dos pacientes, e se apresenta normalmente de forma assimétrica (LOANE *et al.*, 2013). Cabe ressaltar que, no momento em que se observam os sintomas motores, já houve perda de cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e 80% dos terminais dopaminérgicos estriatais (PIRES *et al.*, 2017).

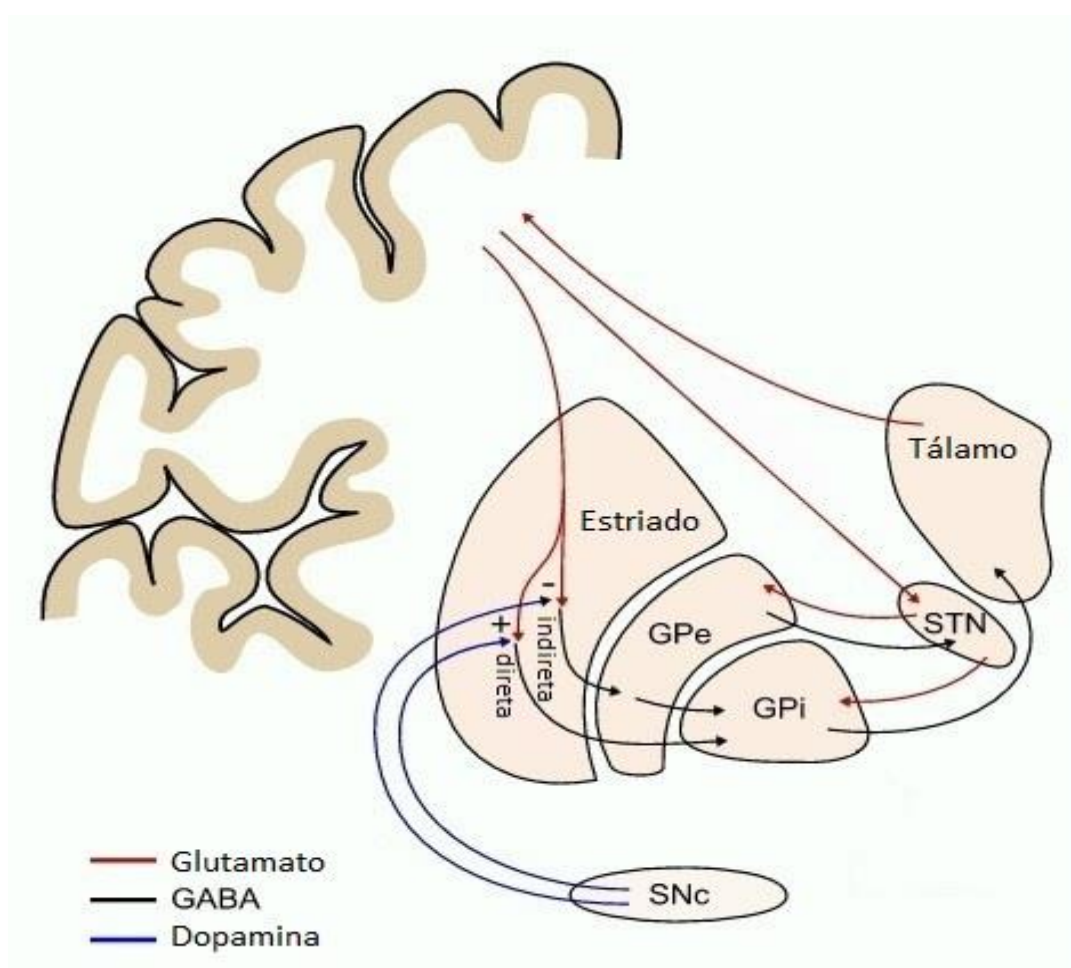


Figura 1: Ilustração dos núcleos da base e modulação dopaminérgica dos movimentos voluntários. Conexões entre o córtex e os núcleos da base. Adaptado de Brittain e Brown, 2014.

Quanto ao diagnóstico da doença, um dos critérios mais antigos utilizados são os critérios do “UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank Diagnostic Criteria”, segundo o qual, o critério inicial para confirmação de parkinsonismo seria a bradicinesia, acrescida de ao menos um dos seguintes sintomas: tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. Há

ainda uma lista com características de exclusão e outras de suporte. A combinação de 3 características de suporte e nenhuma de exclusão dá o diagnóstico definitivo de DP, enquanto que apenas a falta de fatores de exclusão dá o diagnóstico de provável DP (UKPDSBB *apud* GIBB; LEES, 1988).

De forma semelhante, os critérios do Instituto Nacional para a Saúde e Excelência Clínica do Reino Unido (do inglês “National Institute for Health and Care Excellence”) de 2017 incluem como sinais clássicos de diagnóstico o tremor de repouso, bradicinesia, hipocinesia e rigidez – que são observados precocemente de forma unilateral e que, com a progressão da doença, passam a ser bilaterais (NICE, 2017).

Sabe-se ainda que a DP apresenta elevada heterogeneidade e pode ser classificada dentro de vários subtipos de acordo com suas formas clínicas ou início dos sintomas: de início precoce, tremor dominante, não-tremor dominante e progressão rápida sem demência (SELIKHOVA *et al.*, 2009).

Na década de 50, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, o tratamento cirúrgico foi de grande notoriedade para o tratamento da DP, decorrente do desenvolvimento a estereotaxia e pela falta de um medicamento eficaz (FERRAZ *et al.*, 1998). Já em 1968, a Levodopa foi introduzida e, com isso, a cirurgia foi colocada em segundo plano, ao menos na maioria dos centros. A LDOPA é considerada o melhor tratamento para a DP. De início, esse tratamento parecia ser uma solução definitiva, com o tempo ficaram claros seus efeitos colaterais indesejáveis, tais como: as discinesias induzidas, variações “on-off”, “wearing off” e congelamento (LESSER *et al.*, 1979).

A abordagem terapêutica atual ainda se baseia na L-DOPA, um precursor da DA que eleva os níveis desse neurotransmissor no estriado e causa melhora dos sintomas motores da DP. No entanto, sua eficácia diminui gradativamente e não tem a capacidade de intervir na progressão da doença, além de trazer os efeitos adversos já mencionados (GUGLIANDOLO; BRAMANTI; MAZZON, 2016).

A restauração dos níveis de DA nas áreas afetadas ainda é o método mais efetivo e é a estratégia terapêutica padrão para alívio dos sintomas motores, sendo a L-DOPA utilizada de forma combinada com inibidores da dopa descarboxilase (DDCI) periféricos, como o Carbidopa (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Existem, ainda, outros medicamentos utilizados no tratamento sintomatológico da DP, tais como: agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoaminas oxidase B (MAO-B), inibidores da catecol O-metiltransferase (COMT), anticolinérgicos e antiglutamatérgicos

(BRASIL, 2010). Cabe frisar que agonistas dopaminérgicos e L-dopa são efetivos no alívio da bradicinesia e rigidez, já a resposta ao tremor é variada (LOANE *et al.*, 2013).

Outra possibilidade de tratamento é através da estimulação cerebral profunda. No entanto, esse tratamento, assim como os outros, não é livre de efeitos colaterais, e não impede a progressão da doença, sendo necessárias pesquisas para desenvolvimento de métodos de identificação de pessoas em risco ou com manifestações precoces da doença (POEWE *et al.*, 2017).

2.2 Modelo animal de parkinsonismo induzido por baixas doses de reserpina

A reserpina é um alcaloide derivado de raízes da espécie *Rauwolfia serpentina* capaz de provocar alterações neuroquímicas e farmacológicas e sintomas semelhantes aos observados na DP, tanto em humanos (FLACH, 1955) como em animais (FERNANDES *et al.*, 2012; LEÃO *et al.*, 2017).

Foi um dos primeiros modelos de indução de parkinsonismo, já sendo estudado por Flach em 1955, através de um estudo com pacientes psiquiátricos submetidos ao tratamento com reserpina, no qual fez o registro de efeitos adversos como os sintomas semelhantes ao da síndrome parkinsoniana, tais como marcha descoordenada, fraqueza motora e tremores generalizados. Em 1957, Carlsson, Lindqvist e Magnusson também estudaram a reserpina devido à sua propriedade de depleção de monoaminas.

Nos anos 80 a reserpina entrou em desuso devido à sua não seletividade em relação ao sistema dopaminérgico, o que foi visto como uma falha nesse modelo de indução de parkinsonismo (LEAL *et al.*, 2016).

Salamone e Baskin, em 1993, já utilizavam a reserpina na indução aguda de alterações motoras orofaciais, possibilitando a padronização desse modelo como um possível modelo animal do tremor observado na DP.

A reserpina permanece sendo utilizada na pesquisa de indução de discinesia oral em animais – correspondente à discinesia tardia observada em humanos –, e há relatos de que este sintoma estaria relacionado ao estresse oxidativo devido ao acúmulo de produtos da oxidação da DA (SILVA *et al.*, 2002).

Além da indução de alterações motoras, essa droga é também alvo de pesquisas relacionadas aos SNM da DP. Fernandes e colaboradores, em 2008, utilizaram um modelo agudo de administração de baixas doses de reserpina e observaram prejuízos em tarefas que

envolviam contexto emocional numa fase da indução em que não se observavam ainda os SM, corroborando estudos que apontavam que estes eram precedidos pelos SNM.

Inicialmente utilizada como droga anti-hipertensiva por causar depleção celular de monoaminas pela da inibição do transportador de monoaminas vesicular (VMAT) (PETER *et al.*, 1994), foi observado que o uso crônico da reserpina produzia sintomas como depressão (FREIS, 1954) e sintomas da síndrome parkinsoniana (MARKHAM; CLARK; WINTERS, 1963), o que levou a considerar a participação monoaminérgica na fisiopatologia das desordens afetivas e motoras. Embora seja considerada desatualizada quando comparada a outros modelos animais de DP, como MPTP e 6-OHDA, a reserpina mimetiza características chave da sintomatologia, neuroquímica e farmacologia da DP (LEÃO *et al.*, 2015).

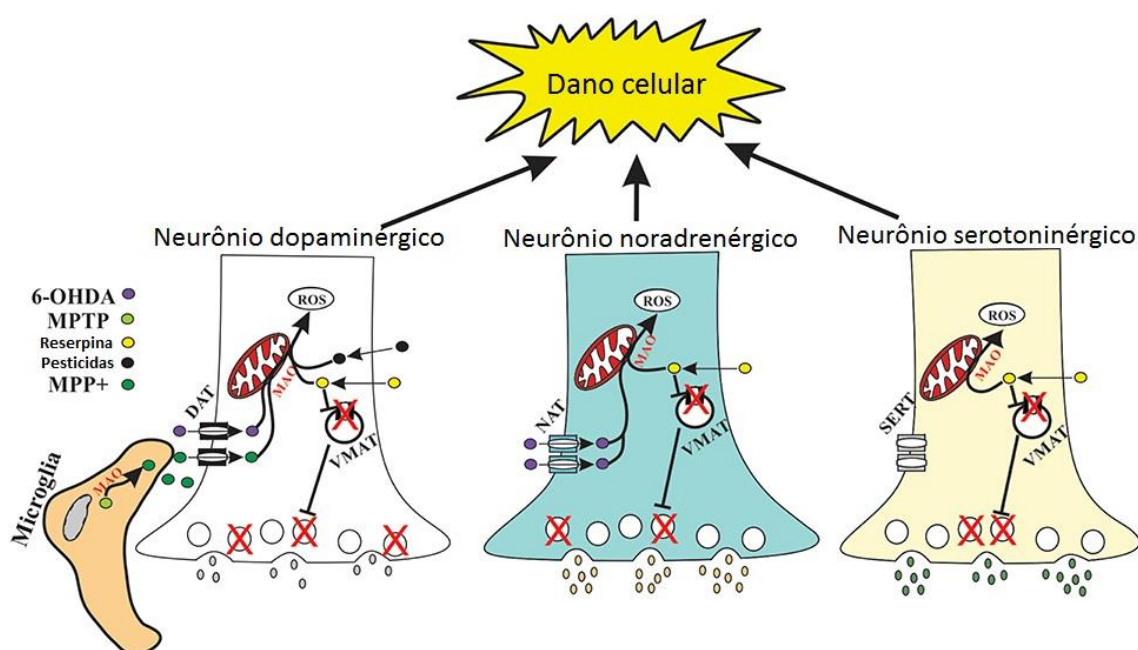


Figura 2: Representação esquemática do efeito de fármacos utilizados na indução de parkinsonismo na transmissão monoaminérgica. Adaptado de LEAL *et al.*, 2015.

O acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica provocado pela reserpina acaba por causar um aumento de espécies reativas de oxigênio (QI; MILLER; VOIT, 2008), e consequente dano celular – processos esquematizados na figura 2. Foi mostrado, em experimentos com ratos, um aumento do estresse oxidativo após administração de baixas doses de reserpina (0,1 mg/kg, em dias alternados), com alterações graduais da função motora, que ocorreram de forma reversível, sem causar morte neuronal e de forma inespecífica para DA, mas com alteração monoaminérgica em geral, fatos estes que

corroboram para a utilização desse modelo como forma de estudo da natureza progressiva da DP (SANTOS *et al.*, 2013).

O modelo de parkinsonismo induzido por baixas doses de reserpina (0,1mg/kg) resulta ainda em aumento da expressão da caspase-3 (LIU *et al.*, 2014) e diminuição de Bcl-2 (EL-GHAZALY *et al.*, 2014), importantes marcadores de apoptose, além do aumento de α -sinucleína (LEÃO *et al.*, 2017) nos animais tratados.

Modelos animais tem sido amplamente utilizados no estudo de alterações comportamentais e neuronais causadas pela DP. No entanto, geralmente, os modelos farmacológicos de indução não fazem correspondência com a natureza progressiva da DP, sendo normalmente aplicados de forma aguda, o que causa rápido aparecimento dos SM (FERNANDES *et al.*, 2012).

2.3 Sistema serotoninérgico e Doença de Parkinson

A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina, é uma indolamina que está distribuída por todo o corpo, cerca de 90% na periferia, onde causa vasoconstrição, facilita a agregação plaquetária, regula funções intestinais e atua como mediador inflamatório. No sistema nervoso central é produzida nos núcleos da rafe e lançada por todo o tecido cerebral. A sua atuação no sistema nervoso está relacionada a alterações de comportamento, humor, ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga e à supressão do apetite (OHNO, 2015; FEIJÓ; BERTOLUCCI; REIS, 2010).

A transmissão serotoninérgica é bastante complexa, envolvendo sete famílias de receptores, dentre os quais, os receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃, que estão mais diretamente envolvidos na ansiedade. Entretanto, embora a 5-HT parece atuar aumentando a ansiedade em modelos que geram conflito, essa amina parece diminuir o medo em outros modelos que induzem resposta de fuga (PINHEIRO *et al.*, 2002; STRAUSS, 2005).

Existem atualmente inúmeras evidências de que a Doença de Parkinson é mais do que uma doença causada apenas pela depleção dopaminérgica. Entre vários outros neurotransmissores que podem ser citados, a serotonina tem papel fundamental na fisiopatologia de manifestações motoras e não motoras da DP, como tremor, depressão, cognição e psicose. Ainda, estudos com modelos animais e em pacientes com DP mostraram evidências do papel da 5-HT nas complicações motoras decorrentes da terapia com L-DOPA, como a discinesia (HUOT *et al.*, 2017).

Os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico estão funcionalmente conectados, de forma que a 5-HT, por meio de seus vários receptores, modula a transmissão dopaminérgica e também os níveis de DA no estriado. Outro fator importante é que, por expressarem AADC e VMAT2, os neurônios serotoninérgicos podem converter a L-DOPA e armazenar a DA, após o uso desse medicamento. Além disso, pesquisas mostraram que o uso de Fluoxetina foi capaz de reverter o comportamento rotacional decorrente do tratamento com L-DOPA após lesão por 6-OHDA, por meio do estímulo de receptores 5-HT1A (INDEN *et al.*, 2012).

Neurônios produtores de 5-HT nos núcleos da rafe se projetam para núcleos dopaminérgicos mesencefálicos – SNpc e VTA – e suas estruturas alvo, como o estriado e o núcleo acumbens. Há evidências de que a modulação serotoninérgica mesolímbica e nigroestriatal da atividade dopaminérgica se dá por meio da família de receptores 5-HT2 (PORDUGIEL *et al.*, 2015).

Outra pesquisa com modelo de lesão da SNpc induzido por 6-OHDA aponta também um efeito protetor desse ISRS – na dose de 1mg/kg, em modelo subcrônico –, com diminuição de fatores pró-apoptóticos e aumento de fatores antiapoptóticos, além de diminuir a latência de tempo na barra nos ratos com hemiparkinsonismo, quando comparado ao grupo não tratado com o ISRS (MAHMOUDI *et al.*, 2011). A melhora da catalepsia e o efeito antiapoptóticos estariam relacionados à estimulação desses receptores 5-HT1A (SHARIFI *et al.*, 2011).

A literatura aponta que a fadiga está relacionada com distúrbios de sono e depressão, ambos presentes em pacientes com DP, e que esse SNM estaria relacionado a baixos níveis de 5-HT estriatais e límbicos (ZHUO *et al.*, 2016).

Em análises pós-morte foi evidenciada perda de projeções serotoninérgicas em paciente com DP, embora em menor extensão do que a perda dopaminérgica (KISH *et al.*, 2008). A literatura também aponta que a disfunção serotoninérgica ocorre precocemente em pacientes com DP (POLITIS *et al.*, 2010) e que seus níveis estão correlacionados aos sintomas não motores, como sintomas de depressão e alterações de peso corporal. Ainda, PET com F-dopa ou ¹¹C-raclopride falharam ao relacionar o tremor a mecanismos pré e pós-sinápticos dopaminérgicos, o que sugere que o tremor da DP pode ser gerado, ao menos em parte, por mecanismos não dopaminérgicos (LOANE *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da fluoxetina sobre as alterações emocionais, motoras e imunohistoquímicas de um modelo progressivo de parkinsonismo.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da fluoxetina sobre o comportamento do tipo ansioso em animais com parkinsonismo;
- Avaliar o efeito da fluoxetina sobre as alterações motoras em diferentes estágios de parkinsonismo provocado pela reserpina;
- Avaliar o efeito da fluoxetina sobre a alteração de peso corporal dos animais tratados com reserpina;
- Investigar as alterações em células imunorreativas a Tirosina Hidroxilase (TH) e Serotonina (5-HT) decorrentes da terapia com fluoxetina em animais submetidos a parkinsonismo provocado por reserpina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 64 ratos Wistar, machos, pesando aproximadamente 500g, com 7 a 9 meses de idade. Os animais foram alojados em número de 04 em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm), sob ventilação e temperatura controladas (22 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pela lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Aroca). Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS), sob protocolo de número 33/2016. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

4.3 Drogas e delineamento experimental

A reserpina foi dissolvida em 50 µl de ácido acético glacial e posteriormente diluída em 50 ml água destilada para compor uma solução de 0,1mg/ml. O veículo da reserpina consiste na mesma quantidade de água destilada e ácido acético glacial usados na solução de reserpina. Estas soluções foram injetadas subcutaneamente. A fluoxetina foi dissolvida em solução salina a 0,9% para compor uma solução de 10mg/ml. O veículo da fluoxetina consiste apenas de solução salina. A fluoxetina e o seu veículo foram injetados por via intraperitoneal.

Durante os 04 dias anteriores ao início dos experimentos, os animais foram manipulados diariamente por 10 minutos para habituação aos experimentadores.

Os aparatos em que foram realizados os experimentos foram limpos com uma solução de álcool a 10% entre um animal e outro, para evitar pistas odoríferas.

Para o desenvolvimento do projeto foram executados dois experimentos:

Experimento 1:

Nesse experimento os animais foram alocados aleatoriamente em 4 grupos ($n = 8$ por grupo): CTR (veículo reserpina + veículo Fluoxetina), F (Veículo reserpina + Fluoxetina), R (veículo fluoxetina + reserpina) e R + F (reserpina + fluoxetina). Os animais receberam injeções a um volume de 1ml/kg. Os animais foram tratados diariamente com injeções i.p de Fluoxetina 10 mg/kg ou veículo (total de 8 injeções) e em dias alternados com injeções s.c. de reserpina 0,1 mg/kg ou veículo (total de 4 injeções).

Ao longo do experimento foram realizados testes comportamentais: (1) catalepsia – diariamente; (2) campo aberto – realizado no dia 7 (24 h após a 4ª injeção de reserpina) e (3) movimentos orofaciais – realizado no dia 8 (48 h após a 4ª injeção de reserpina). O esquema do delineamento experimental 1 é mostrado na **Figura 3**.

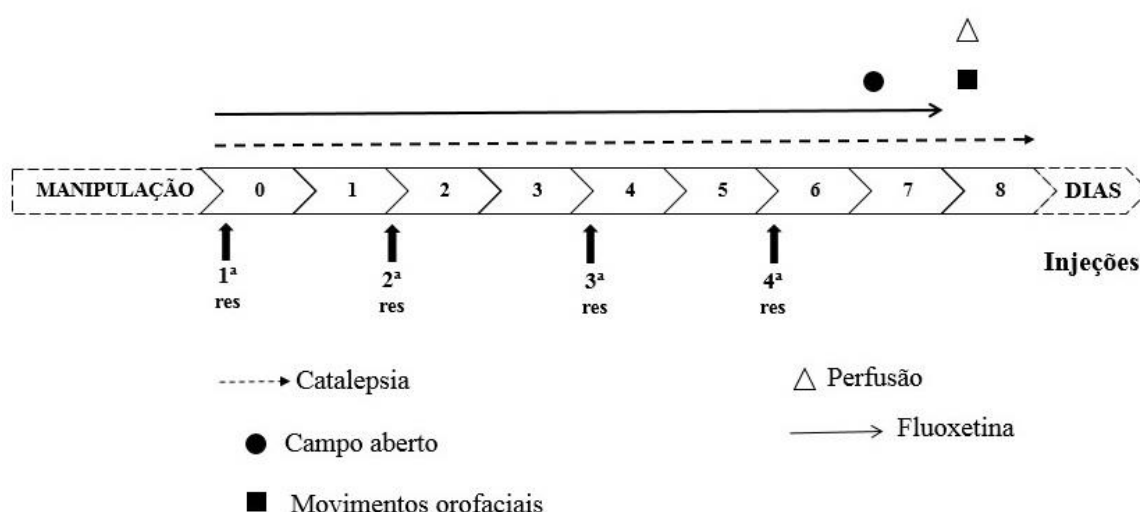


Figura 3: Ilustração esquemática do experimento 1.

Experimento 2:

Nesse experimento os animais também foram alocados aleatoriamente em 4 grupos ($n = 8$ por grupo): CTR (veículo reserpina + veículo Fluoxetina), F (Veículo reserpina + Fluoxetina), R (veículo fluoxetina + reserpina) e R + F (reserpina + fluoxetina), entretanto, diferente do experimento 1, o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) ou seu veículo iniciou-se apenas 48h após a 4ª injeção de reserpina (totalizando 13 injeções i.p de fluoxetina). Os animais receberam injeções a um volume de 1 ml/kg e foram tratados em dias alternados com injeções s.c. de reserpina 0,1 mg/kg ou veículo (total de 10 injeções).

A proposta desse segundo experimento foi de avaliar os efeitos de uma administração mais tardia da fluoxetina, a título de comparação entre a administração precoce e tardia.

Ao longo do experimento foram realizados testes comportamentais: (1) catalepsia – diariamente; (2) campo aberto – realizado nos dias 9 e 21 (48h após a 4ª e a 10ª injeções de reserpina) e (3) movimentos orofaciais – realizado nos dias 11 e 19 (48h após a 5ª e a 9ª injeções de reserpina). O esquema do delineamento experimental 2 é mostrado na **Figura 4**.

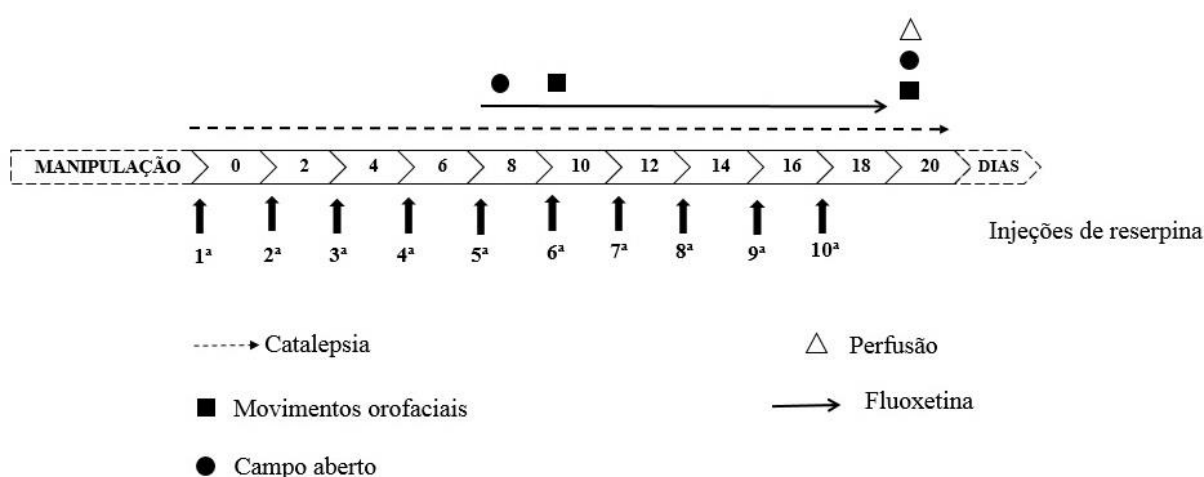


Figura 4: Ilustração esquemática do experimento 2.

4.4. Testes Comportamentais

4.4.1. Teste de Catalepsia

A catalepsia é definida como um estado comportamental caracterizado por inibição motora e rigidez muscular que pode ser induzido experimentalmente por uma depleção de dopamina, o que ocorre após o tratamento com reserpina ou 6-OHDA (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 9,0 cm da superfície de apoio das patas traseiras (figura 5). O tempo de permanência nesta posição foi considerado como medida de catalepsia e foi mensurada a latência para o animal iniciar um movimento, ou seja, sair da posição inicial. Os animais foram submetidos ao aparato três vezes

consecutivas até um limite de 180 segundos e para cada dia foi realizada uma média do tempo das três tentativas (SANTOS, 2012).



Figura 5: Teste de catalepsia. Adaptado de BISPO, 2016.

4.4.2. Teste do Campo Aberto

O campo aberto é um aparato circular (raio = 84 cm, altura = 35 cm) e sem o teto, como mostrado na figura 6. Os animais foram colocados no centro do aparato e permaneceram nele por 10 minutos para livre exploração. Uma câmera, conectada a um computador, foi colocada sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm e os parâmetros comportamentais foram registrados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA). Foram avaliados os seguintes parâmetros: 1- distância total percorrida; 2- número de entradas no centro; 3- tempo de permanência em cada uma das zonas do campo (interna e externa); e 4- número de rearing. Cada animal foi avaliado individualmente e o aparato foi limpo com uma solução de etanol a 5% entre os testes (SANTOS, 2012).



Figura 6: Teste de campo aberto.

4.4.3. Avaliação dos movimentos orofaciais

Os ratos foram colocados individualmente em uma gaiola gradeada (40 cm x 40.5 cm x 20 cm) com espelhos fixados abaixo e atrás das gaiolas, permitindo que o pesquisador visualizasse o animal em qualquer posição. Os animais foram observados por 10 minutos e foram mensurados os seguintes comportamentos: 1- frequência de movimentos de mastigação que não são direcionados a nenhum objeto; e 2 - a duração (em segundos) de espasmos da musculatura facial.

4.5 Pesagem

Os animais foram pesados em dias alternados para adequação das doses e verificação de possível perda de peso. A pesagem ocorreu ao final dos experimentos comportamentais de forma que houvesse mínima manipulação antes dos testes. Os equipamentos utilizados para pesagem foram uma balança SF-400 e uma caixa de plástico retangular sem tampa, medindo 15x10x10 cm. Foi realizada limpeza no interior da caixa com solução de álcool a 10% entre uma pesagem e outra.

4.6 Perfusão dos animais e processamento do cérebro

Ao final do tratamento e testes comportamentais, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União) e cloridrato de xilazina (Calmun®, Agener União) intramuscular (i.m.) nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg respectivamente. Com o animal completamente anestesiado, foi realizado um acesso à cavidade torácica seccionando-se a pele e partes moles, expondo a cavidade abdominal e fazendo-se a incisão do músculo diafragma para que o coração ficasse exposto.

Posteriormente, foi realizada a inserção de uma agulha no ventrículo esquerdo através do ápice deste, posicionando a agulha na direção da aorta. Depois foi realizada uma pequena incisão no átrio direito. Foi então injetado um volume de 300-350 ml de solução salina 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH=7,4, heparinizado 0,2%. Após esta etapa, foram injetados 350 ml de uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH = 7,4. Após a perfusão, os cérebros foram removidos através de craniotomia e mergulhados em uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 4°C por 48 horas. Depois deste período, os cérebros serão crioprotégidos por 24 horas em sacarose 30%, também a 4°C.

4.7 Imunohistoquímica para Tirosina-Hidroxilase e 5-HT

Para a avaliação imunohistoquímica, foram selecionados aleatoriamente os cérebros de 6 animais de cada grupo. Cabe ressaltar que, para o núcleo dorsal da rafe, SNpc e VTA do experimento 2, foram analisadas amostras de 5 animais devido à impossibilidade de aproveitamento do material.

Durante a realização dos procedimentos da imunohistoquímica, as secções cerebrais foram lavadas em solução de tampão fosfato – PB – (0,1M / pH 7,4) e triton (0,3%) três vezes por cinco minutos, sob agitação automática, e pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram colocados em contato com anticorpo primário monoclonal anti-TH ou 5-HT produzido em coelho (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) diluído em PB contendo Triton-X 100 (ICN Biomedicals) a 0,4% e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% durante o período de 18 a 24 horas (22°C). Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotinilado (cabra anti-coelho), na concentração de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A), diluído em Triton-X 100 a 0,4%, por 2 horas. Após esta etapa, os cortes foram incubados numa solução contendo complexo avidina biotina (ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, USA) por 90 minutos. Para visualizar a reação, os cortes foram colocados em contato com um cromógeno, a diaminobenzidina-DAB (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4) e 0,01% de H₂O₂.

As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e em seguida desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de álcoois, clareadas com xilol e as lamínulas fixadas com Entellan. Uma série adjacente foi corada com tionina para servir como referência para fins de localização das áreas. As secções foram examinadas por iluminação de campo claro e as imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital acoplada ao microscópio e as localizações das áreas foram determinadas usando o atlas Paxinos e Watson (2007).

4.8 Aquisição de imagens e contagem de células

Para cada animal analisado foram feitas imagens dos cortes, com objetivas de aumento de 10x, nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou a ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem de células foi realizada em 4 secções de cada animal e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. Todas as células TH⁺ das áreas de interesse (VTA e SNpc) foram contadas usando o programa Image J (versão 1.46i, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). Todas as contagens foram realizadas de forma “cega”, onde o experimentador não soube a que grupo pertencia cada imagem a ser contada. Os valores para

cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

4.9 Avaliação da Densitometria Óptica Relativa – DOR

Para a análise da DOR as imagens foram obtidas em um mesmo momento, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste, uma vez que os valores em pixels encontrados em cada imagem correspondem a uma intensidade maior ou menor de marcação de determinada substância no tecido analisado. Cada animal foi representado por 4 imagens consecutivas para cada área de interesse. Na mesma imagem também foi selecionado um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação de TH (ESTd) e 5-HT (NDR). O número médio de pixels calculados nos campos de interesse foi subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

4.10 Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados foram bastante variados, pois dependeram dos protocolos experimentais. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal para todas as variáveis, então foram aplicados testes paramétricos apropriados. Os dados também foram submetidos a verificação de outliers para posterior aplicação dos testes. Os testes de catalepsia foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, com pós-teste de Fisher's LSD; para as atividades de campo aberto foram utilizados ANOVA de uma via, e o teste t simples foi realizado apenas para avaliação do campo aberto após a 4ª injeção de reserpina no experimento 2; para avaliação dos movimentos orofaciais foi também realizada ANOVA de uma via; e para análise da alteração de peso corporal, foi realizada ANOVA de duas vias com pós-teste de Fisher's LSD. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$. Os

valores são expressos pela média e erro padrão da média. O programa para realização dos testes estatísticos foi o Prisma versão 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da administração repetida de fluoxetina em estágios iniciais do parkinsonismo induzido por reserpina.

5.1.1 Comportamento de catalepsia

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(4, 136) = 30,24, p < 0,0001$], tratamento (CTR, F, F + R, R) [$F(3, 34) = 3,726, p = 0,0203$] e interação tempo x tratamento [$F(12, 136) = 3.043, p = 0,0008$] no teste de catalepsia. O pós-teste de Fisher's LSD revelou aumento significativo do tempo de permanência na barra dos animais do grupo F+R quando comparado aos demais grupos a partir do 6º dia de tratamento até o final do experimento. Em comparação ao grupo CTR ($p^6 < 0,0001$ e $p^8 = 0,0003$, respectivamente); ao grupo F, $p^6 = 0,0004$ e $p^8 = 0,0239$, respectivamente; ao grupo R, $p^6 < 0,0001$ e $p^8 = 0,0009$, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os demais grupos para este parâmetro.

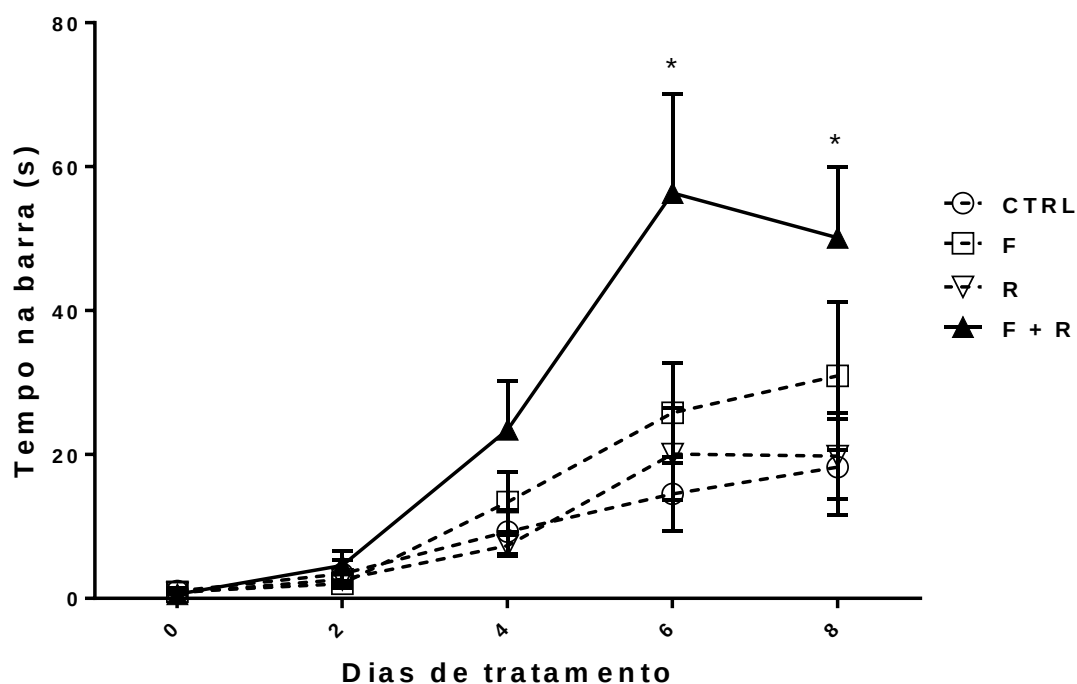


Figura 7: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre o comportamento de catalepsia em animais submetidos à indução de parkinsonismo com 4 doses de reserpina (0,1

mg/kg). Animais tratados com fluoxetina e reserpina (F + R) apresentaram maior latência para sair da barra. Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M e considerados significativos quando $*p < 0,005$ para F + R quando comparado a todos os outros grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher's LSD).

5.1.2 Atividade no campo aberto

A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) na distância total percorrida [$F(3, 34) = 7,085$, $p = 0,0008$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou diminuição da distância total percorrida do grupo F + R em relação aos grupos CTR, F e R ($p < 0,0001$, $p = 0,0056$ e $p = 0,0290$, respectivamente). O grupo R mostrou também diminuição da distância percorrida em relação ao controle total ($p = 0,0356$).

Quanto ao número de rearing, a ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 34) = 8,625$, $p = 0,0002$] e o pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo tratado F + R quando comparado aos grupos CTR e F ($p = 0,0001$ e $p = 0,0085$), mas não em relação ao grupo R ($p = 0,2263$). O grupo R também apresentou diminuição do número de rearing em relação ao grupo CTR ($p = 0,0360$).

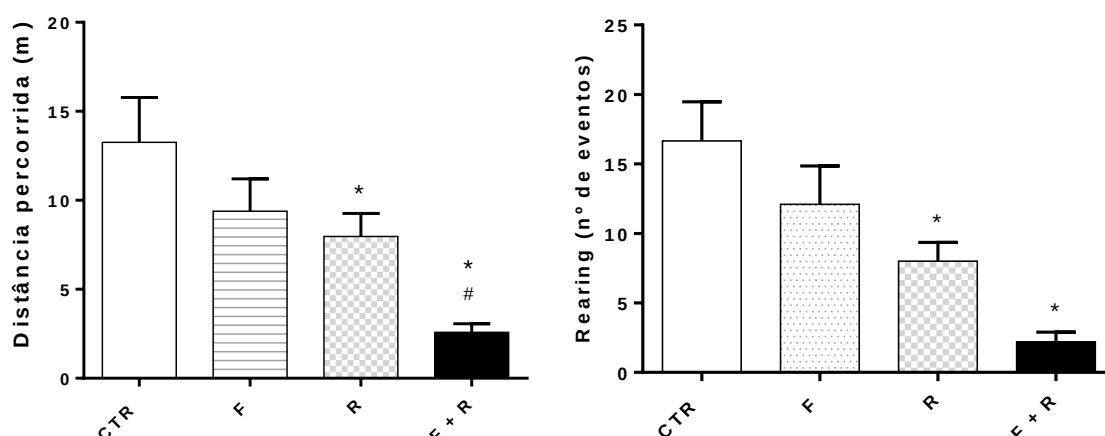


Figura 8: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre a distância percorrida e número de rearing. Para esses parâmetros, os grupos F + R e R apresentaram resultados semelhantes em relação ao grupo CTR ($*p < 0,05$). Quanto à distância percorrida, o grupo F + R apresentou resultado em maior amplitude e teve diferença estatística em relação ao grupo R ($\#p = 0,0290$) após ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher's LSD. Os valores são expressos pela média e E.P.M.

A ANOVA de uma via também mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 35) = 6,669$, $p = 0,0011$] na avaliação do número de entradas no centro do campo. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou a diferença entre os grupos F + R e o grupo CTR ($p = 0,0005$) e também entre o grupo R e o grupo CTR ($p = 0,0398$).

A ANOVA de uma via não evidenciou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) no tempo de permanência no centro [$F(3, 31) = 1,131$, $p = 0,3517$].

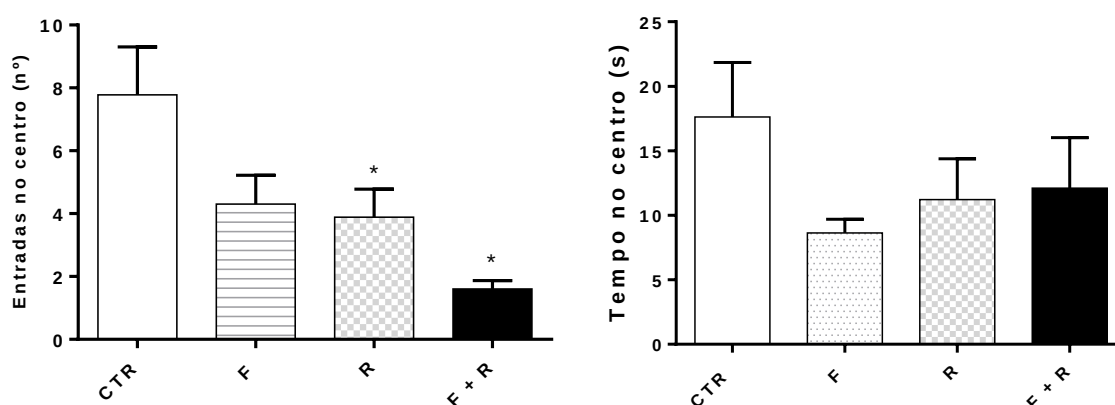


Figura 9: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre a exploração do centro do campo aberto dos animais tratados com reserpina (0,1 mg/kg). Os animais dos grupos F + R e R apresentaram diminuição do número de entradas no centro em relação ao CTR (* $p < 0,05$). Foi utilizada ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher's LSD. Os valores são expressos pela média e E.P.M.

5.1.3 Movimentos orofaciais

A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) na avaliação do tremor oral [$F(3, 29) = 5,388$, $p = 0,0045$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou diferença entre o grupo F + R e o grupo CTR, com $p = 0,0046$; para F, $p = 0,0023$; e para R, o valor de p foi de 0,0044.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação aos movimentos de mandíbula.

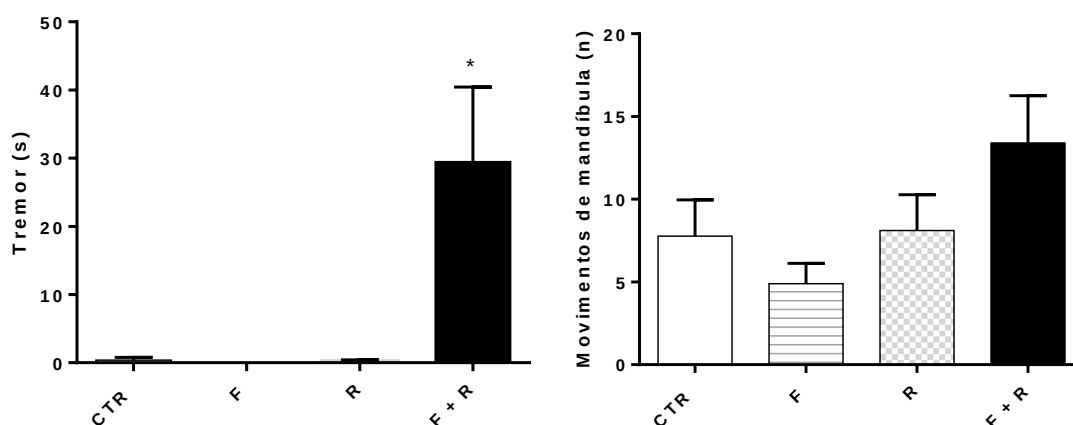


Figura 10: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) ou veículo sobre os movimentos orofaciais de animais submetidos à indução de parkinsonismo com doses repetidas de reserpina (0,1 mg/kg). O grupo F + R apresentou aumento do tempo de tremor oral pelo em relação aos demais grupos (* $p < 0,05$). Foi utilizada ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher's LSD. Os valores são expressos pela média e E.P.M.

5.1.4 Variação de peso corporal

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(2, 70) = 83.14$, $p < 0,0001$], tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 35) = 8.578$, $p < 0,0001$], e interação tempo x tratamento [$F(6, 70) = 18.39$, $p < 0,0001$] nas medidas de alteração de peso dos animais tratados. O pós-teste de Fisher's LSD revelou diminuição significativa do peso dos animais do grupo F + R nos dias 4 e 6 quando comparado ao grupo CTR ($p^4 = 0,0008$ e $p^6 < 0,0001$) e também em relação ao grupo R ($p < 0,0001$, em ambos os dias). O grupo F também apresentou diferença em relação aos grupos CTR ($p^4 = 0,0035$ e $p^6 < 0,0001$) e R ($p^4 = 0,002$ e $p^6 < 0,0001$).

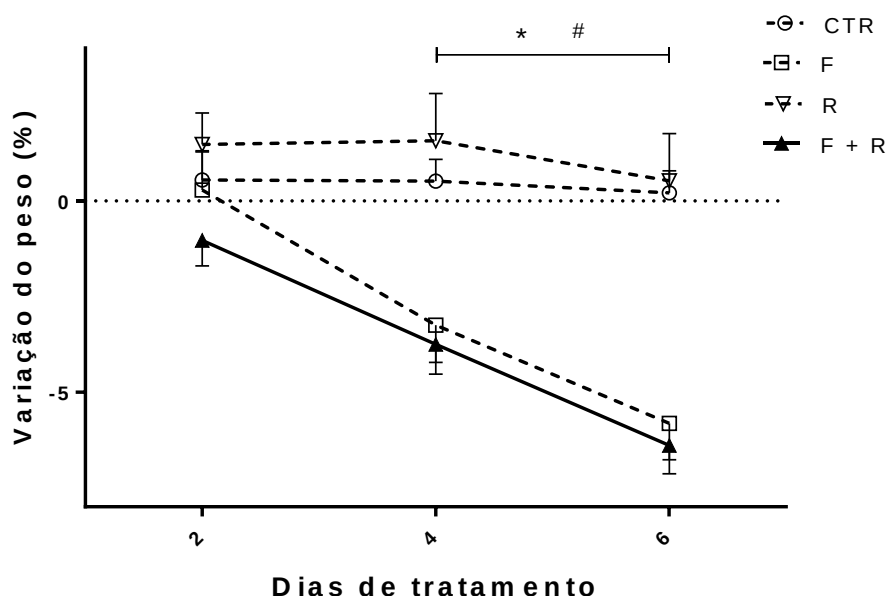


Figura 11: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre a variação de peso dos animais submetidos a doses repetidas de reserpina (0,1 mg/kg). Os grupos F + R e F apresentaram diferença em relação ao grupo CTR ($*p^4 = 0,008$, $*p^6 < 0,0001$, $\#p^4 = 0,035$ e $\#p^6 < 0,0001$, respectivamente). A análise estatística foi feita com ANOVA de duas vias com medidas repetidas e pós-teste de Fisher's LSD. Os valores são expressos pela média e E.P.M.

5.1.5 Imunorreatividade para TH

Através de ANOVA de uma via não foi observado efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) na imunorreatividade para células TH⁺ tanto em VTA [$F(3, 20) = 0,1664$, $p = 0,9178$] quanto na SNpc [$F(3, 20) = 17,12$, $p = 9146$].

Quanto à Densidade Óptica Relativa no ESTd, foi realizada ANOVA de uma via e constatado efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 20) = 13,00$, $p < 0,0001$]. Foram constatadas diferenças significativas, segundo o pós-teste de Fisher's LSD, para os grupos F e F + R em relação ao grupo controle, com valores de $p = 0,0023$ e $p = 0,0022$, respectivamente. Em relação ao grupo R, esses mesmos grupos também apresentaram diferenças significativas, com os valores de $p = 0,0009$ para ambos.

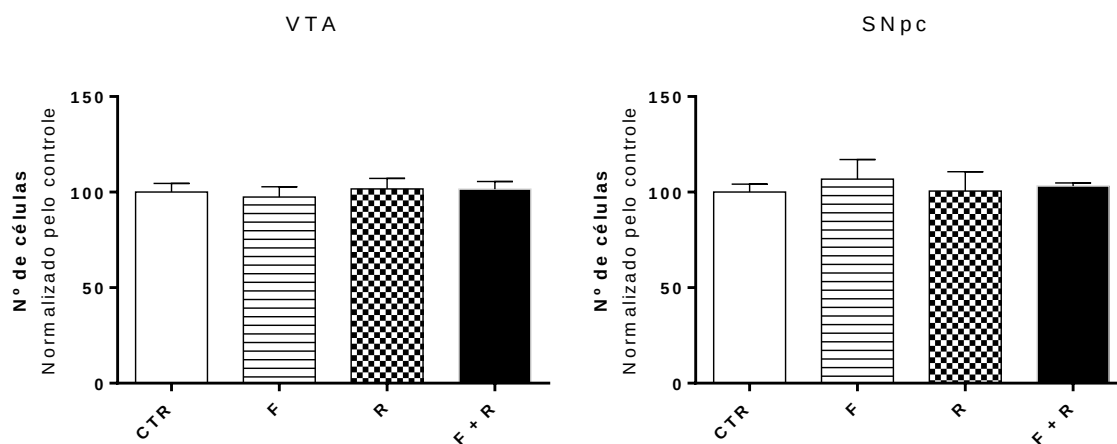


Figura 12: Efeito da administração de fluoxetina (10 mg/kg) na D.O.R de VTA e SNpc de animais submetidos a parkinsonismo com 4 injeções de reserpina (01, mg/kg). Não foi observado efeito do tratamento para estas áreas (ANOVA de uma via). Os valores são expressos pela média e E.P.M.

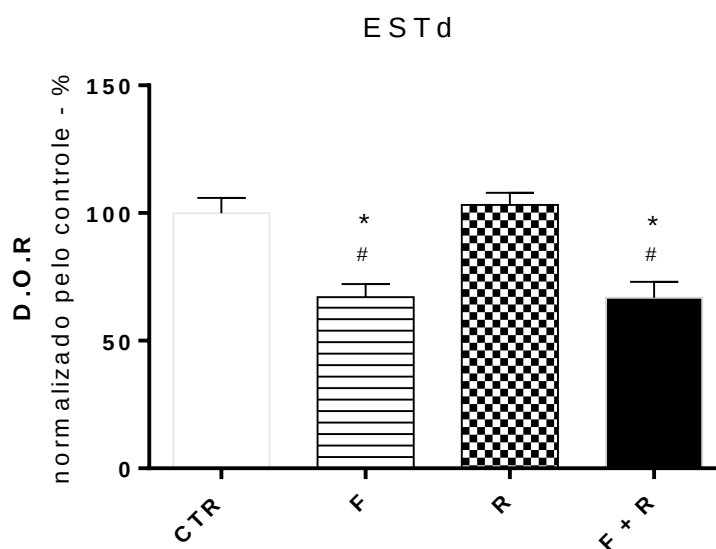


Figura 13: Efeito da administração repetida de Fluoxetina (10mg/kg) em animais com parkinsonismo na expressão de TH do ESTd. Os animais tratados com o ISRS apresentaram diminuição da Densidade Óptica Relativa para TH, com valor de $p^* < 0,05$ em relação ao grupo CTR e $p^\# < 0,05$ quando comparados ao grupo R (ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher's LSD). Os valores estão expressos pela média e E.P.M. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

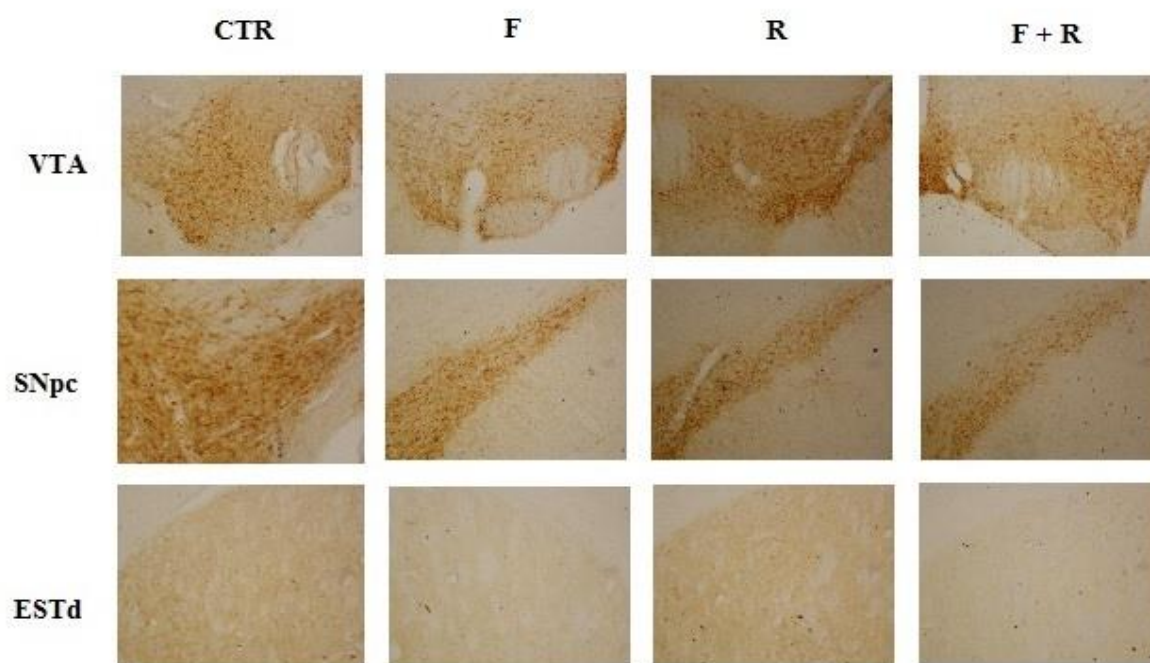


Figura 14: Imagens representativas do efeito da administração precoce de fluoxetina (10 mg/kg) número de células TH+ em VTA e na SNpc e da imunorreatividade para TH no ESTd dos animais tratados com 4 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Barra de escala 100 μ m.

5.1.6 Imunorreatividade para Serotonina

Foi realizada ANOVA de uma via e foi observado efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 20) = 25,80$, $p < 0,0001$] na imunorreatividade para serotonina. Foi evidenciada diferença significativa de acordo com o pós-teste de Fisher's LSD para todos os grupos em relação ao CTR. O grupo F apresentou aumento da D.O.R no NDR em relação ao grupo CTR e ao grupo R, $p = 0,0225$ e $p < 0,0001$, respectivamente. O grupo F + R apresentou resultados semelhantes, com aumento da D.O.R quando comparado ao grupo CTR e ao grupo R, com valores de $p = 0,0044$ e $p < 0,0001$, respectivamente. O grupo R apresentou diminuição da D.O.R no NDR, com valor de $p = 0,0039$ quando comparado ao grupo CTR. Os grupos F + R e F não apresentaram diferenças entre si.

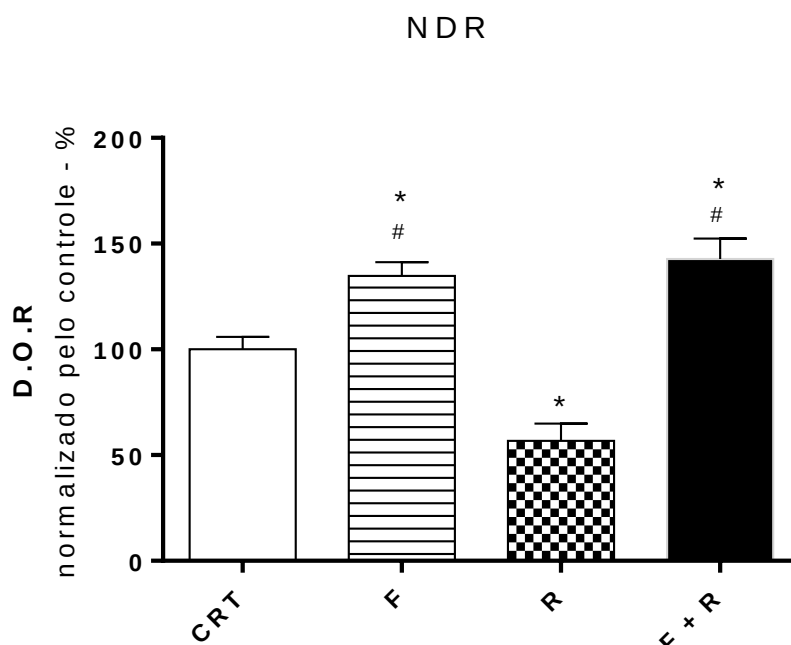


Figura 15: Efeito da administração precoce de fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para 5-HT de animais submetidos a parkinsonismo por reserpina (0,1 mg/kg). Os grupos F e F + R apresentaram aumento da D.O.R no NDR, com valor de $p^* < 0,05$ quando comparados ao CTR e $p^# < 0,05$ quando comparados ao grupo R sem diferença entre eles. Os animais do grupo R foram sensíveis ao efeito deletério da depleção monoaminérgica, com $p^* < 0,05$ (Anova de uma via com pós-teste de Fisher's LSD). Os valores são expressos como média e E.P.M e considerados significativos quando $p < 0,05$.

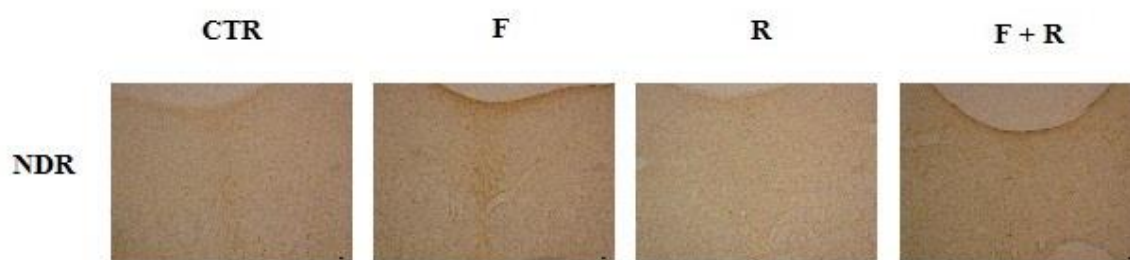


Figura 16: Imagens representativas do efeito da fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade do NDR de animais submetidos a 4 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Barra de escala: 100 μ m.

5.2 Efeito da administração repetida de fluoxetina antes das alterações motoras em animais induzidos a parkinsonismo pela reserpina.

5.2.1 Comportamento de catalepsia

Através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas, observou-se efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(10, 250) = 30,29$, $p < 0,0001$], tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 25) = 14,42$, $p < 0,0001$] e interação tempo x tratamento [$F(30, 250) = 9,922$, $p < 0,0001$] no teste de catalepsia. O pós-teste de Fisher's LSD revelou aumento significativo do tempo de permanência na barra dos animais do grupo F + R em relação aos demais grupos a partir do 12º dia de tratamento: quando comparado ao grupo CTR ($p^{12,14,16,18 \text{ e } 20} < 0,0001$); ao grupo F ($p^{12,14,16,18 \text{ e } 20} < 0,0001$); em relação ao grupo R ($p^{12} = 0,0013$, $p^{14} < 0,0001$, $p^{16} = 0,0323$), não sendo apresentada diferença a partir do 18º dia.

O grupo R também apresentou diferença estatística em relação ao grupo CTR ($p^{12} = 0,0171$, $p^{16,18 \text{ e } 20} < 0,0001$); e ao grupo F ($p^{12} = 0,0458$, $p^{16,18 \text{ e } 20} < 0,0001$).

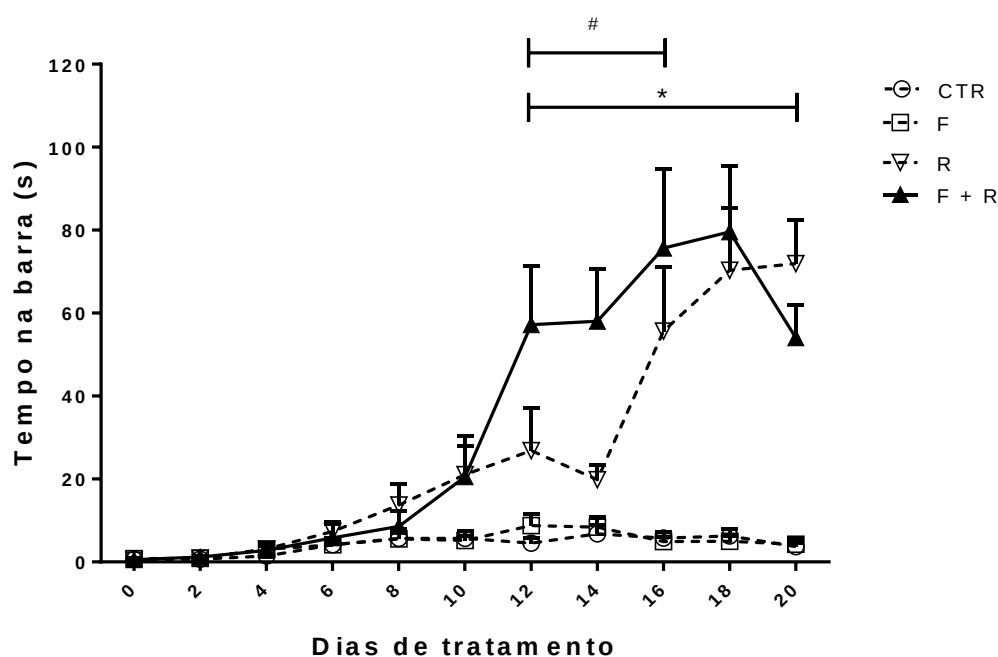


Figura 17: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo sobre o comportamento de catalepsia de animais submetidos à indução de parkinsonismo com doses repetidas de reserpina (0,1 mg/kg). O grupo F + R apresentou maior latência para sair da barra, quando comparado ao grupo CTR e grupo R, com $p^* < 0,05$ e $p^\# < 0,05$, respectivamente. A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas e pós-teste de Fisher's LSD. Os dados foram expressos como média e E.P.M e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,005$.

5.2.2 Atividade no campo aberto

As tarefas no campo aberto foram executadas em dois momentos neste segundo experimento – 48h após a 4ª e a 10ª injeções de reserpina –, de modo a avaliar o comportamento antes e depois da introdução da fluoxetina, e, dessa forma, os resultados estão descritos em tópicos separados.

5.2.2.1 Atividade no campo aberto após a 4ª injeção de reserpina

Neste momento, ainda não se havia dado início à administração da fluoxetina. Para avaliação dos parâmetros observados, um teste t simples foi aplicado e evidenciou diferença entre os grupos R e CTR quanto à distância total percorrida ($p = 0,0431$). Foi observada diferença também em relação ao número de rearing e à duração do rearing entre os dois grupos ($p = 0,0017$ e $p = 0,0007$, respectivamente). Não foi observada diferença entre os grupos quanto à porcentagem de tempo no centro ou o número de entradas no centro.

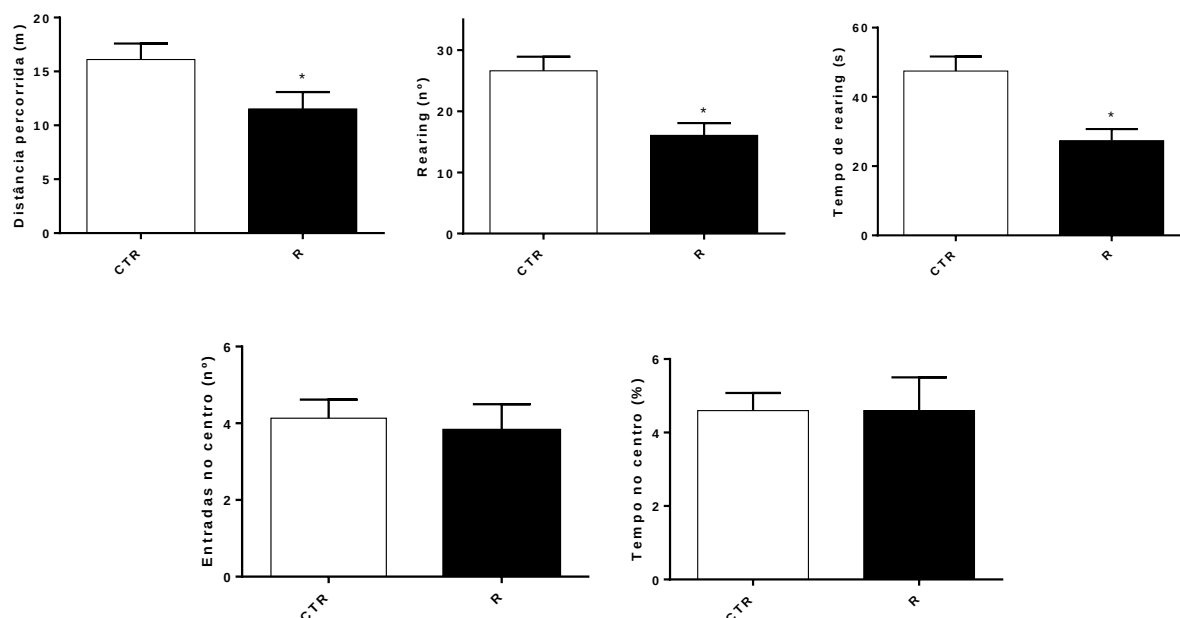


Figura 18: Diferença entre os grupos CTR e R, nas atividades de campo aberto após 4 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Foi observada diminuição da distância percorrida, do n° e tempo de rearing dos animais do grupo R, mas não em relação ao número de entradas no centro e porcentagem de tempo no centro (teste T simples). Os valores são expressos pela média e E.P.M e os foram considerados significativos quando $*p < 0,005$.

5.2.2.2 Atividade no campo aberto após a 10ª injeção de reserpina

Quanto à distância total percorrida, através da ANOVA de uma via, foi observado efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 27) = 5,015$, $p = 0,0068$] e o pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo F + R os grupos CTR e F ($p = 0,0337$ e $p = 0,0035$, respectivamente), no entanto, já não foi observada diferença em relação ao grupo R ($p = 0,9798$). O grupo R também apresentou diferença em relação aos grupos CTR e F ($p = 0,0421$ e $p = 0,0053$, respectivamente).

De forma semelhante, ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) em relação ao número de rearing [$F(3, 25) = 6,653$, $p = 0,0019$]. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo F + R e os grupos CTR e F ($p = 0,0224$ e $p = 0,0013$, respectivamente), e não apresentou diferença em relação ao grupo R ($p = 0,6531$). O grupo R também apresentou diferença em relação aos grupos CTR e F ($p = 0,0181$ e $0,0016$, respectivamente).

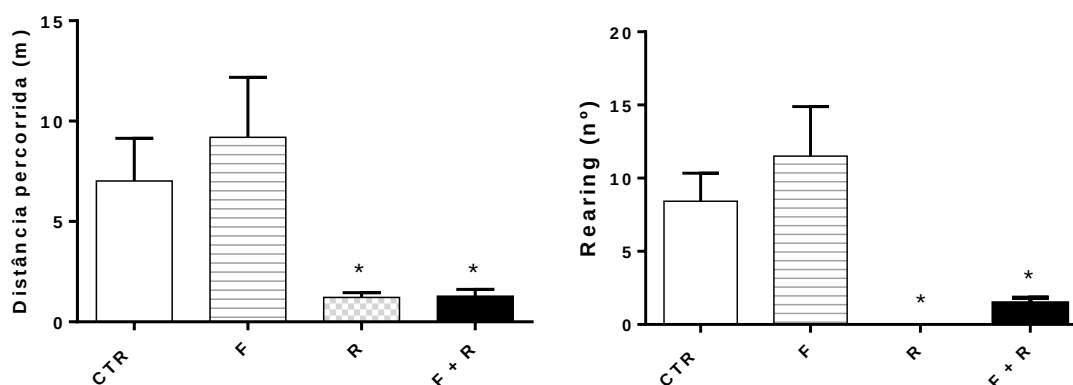


Figura 19: Diminuição da distância total percorrida (m) e número de rearing dos grupos F + R e R na tarefa de campo aberto após 10 injeções de reserpina ($p^* < 0,05$). Apenas o grupo F apresentou aumento do tempo de rearing, com $p^* < 0,05$ (ANOVA de uma via com pós-teste de Fisher's LSD). Os valores são expressos pela média e E.P.M e a diferença considerada significativa quando $*p < 0,05$.

Em relação ao tempo de rearing, ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 25) = 6,163$, $p = 0,0028$]. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou

diferença entre o grupo F e os grupos CTR, R e F + R ($p = 0,0372$, $p = 0,0015$ e $p = 0,0009$, respectivamente).

ANOVA não evidenciou efeito do tratamento quanto ao número de entradas no centro.

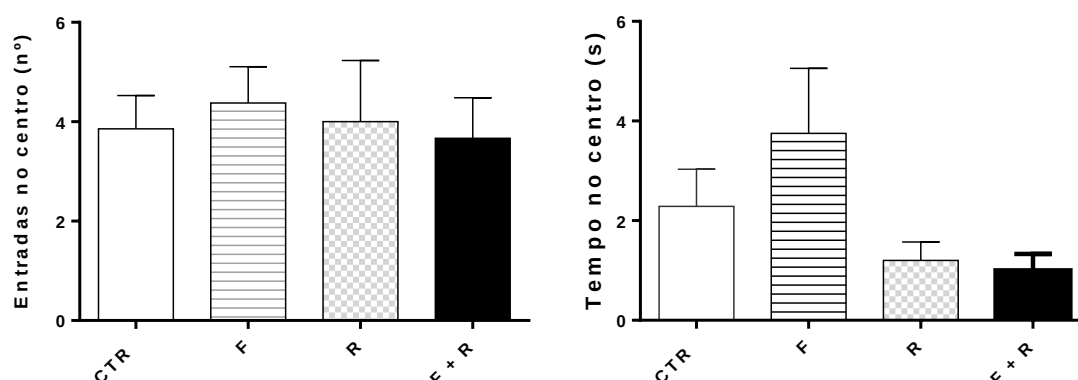


Figura 20: Ação da fluoxetina (10 mg/kg) na exploração do centro do campo aberto observadas após 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Neste período não mais foi observado efeito do tratamento em nenhum dos parâmetros avaliados (ANOVA de uma via). Os valores são expressos pela média e E.P.M e a diferença considerada significativa quando $*p < 0,05$.

5.2.3 Movimentos Orofaciais

Para análise desses parâmetros após a 5ª injeção de reserpina, a ANOVA de uma via foi aplicada e mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 26) = 6,276$, $p = 0,0024$] na avaliação dos movimentos de mandíbula. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo F + R e os grupos CTR, F e R ($p = 0,0179$, $p = 0,0003$ e $p = 0,0055$, respectivamente).

Na análise do tremor orofacial, a ANOVA de uma via foi aplicada e mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 23) = 4,435$, $p = 0,0134$]. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo F + R os grupos CTR, F e R ($p = 0,0416$, $p = 0,0041$, $p = 0,0093$, respectivamente).

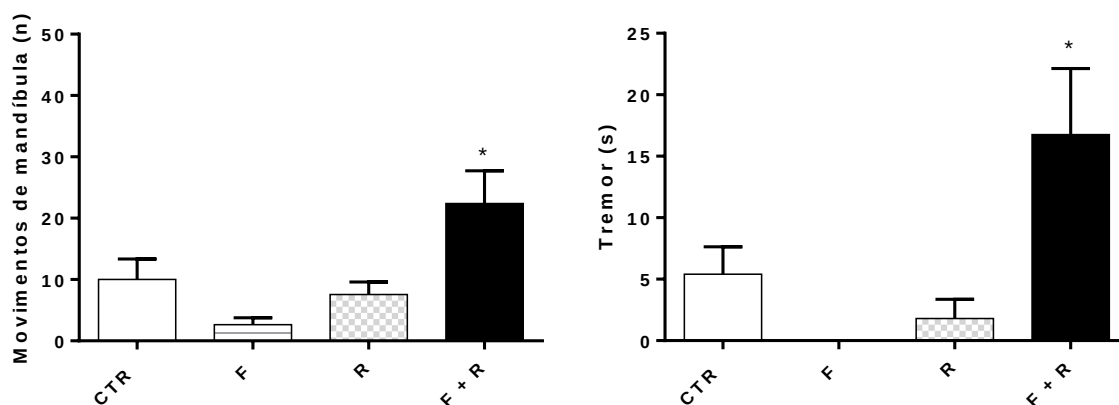


Figura 21: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) ou veículo sobre os movimentos orofaciais após a 5ª injeção de reserpina (0,1 mg/kg). Foi observado aumento do número de movimentos de mandíbula e duração do tremor orofacial dos animais tratados com F + R em relação aos demais grupos, $p^* < 0,05$ (ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher's LSD). Os valores são expressos pela média e E.P.M.

Após a 9ª injeção de reserpina, a ANOVA de uma via apontou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) nos movimentos de mandíbula [$F(3, 26) = 15,63$, $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo F + R os grupos CTR, F e R ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0019$, respectivamente). Ainda em relação a este parâmetro, o grupo R também apresentou diferença em relação aos grupos CTR e F ($p = 0,0402$ e $p = 0,0309$, respectivamente).

Quanto ao tremor orofacial, a ANOVA de uma via apontou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 23) = 4,323$, $p = 0,0148$] e o pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferença entre o grupo F + R os grupos CTR, F e R ($p = 0,0098$, $p = 0,0057$ e $p = 0,0267$, respectivamente). Para este parâmetro o grupo R não mostrou diferença em relação aos controles.

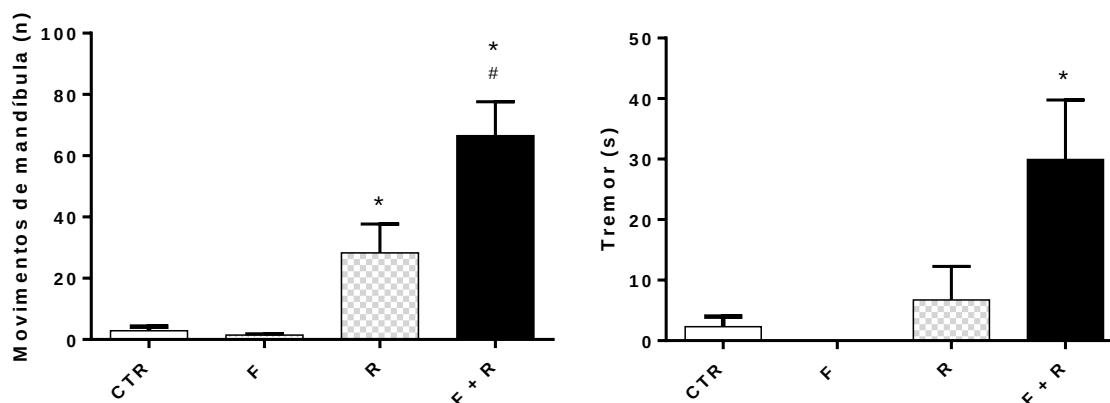


Figura 22: Efeito da administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) ou veículo sobre os movimentos orofaciais após a 9ª injeção de reserpina (0,1 mg/kg). O grupo F + R apresentou aumento dos movimentos de mandíbula em relação ao CTR, com $p^* < 0,05$ e em relação a R com $p^{\#} < 0,05$. O grupo R apresentou aumento dos movimentos de mandíbula, $p^* < 0,05$. A análise foi feita através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Fisher's LSD. Os valores são expressos pela média e E.P.M.

5.2.4 Variação de peso corporal

Foi realizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas, que revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(5, 135) = 45.86, p < 0,0001$], tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 27) = 3.705, p = 0,0236$], e interação tempo x tratamento [$F(15, 135) = 8.106, p < 0,0001$] nas medidas de alteração de peso dos animais. Foi realizado o pós-teste de Fisher's LSD e foi observada maior perda ponderal no grupo F + R quando comparado aos grupos CTR ($p^{12} = 0,013, p^{15} < 0,0001$ e $p^{18} < 0,0001$) e R ($p^{12} = 0,0330, p^{15} = 0,0002$ e $p^{18} < 0,0001$); quando comparado ao grupo F, foi observada diferença a partir do dia 15 ($p^{15} = 0,0020$ e $p^{18} < 0,0001$).

O grupo F também apresentou diferença em relação ao CTR a partir do dia 12 ($p^{12} = 0,045, p^{15} = 0,0262$ e $p^{18} = 0,0026$), enquanto o grupo R apresentou diferença em relação ao CTR somente no dia 18 ($p = 0,0086$).

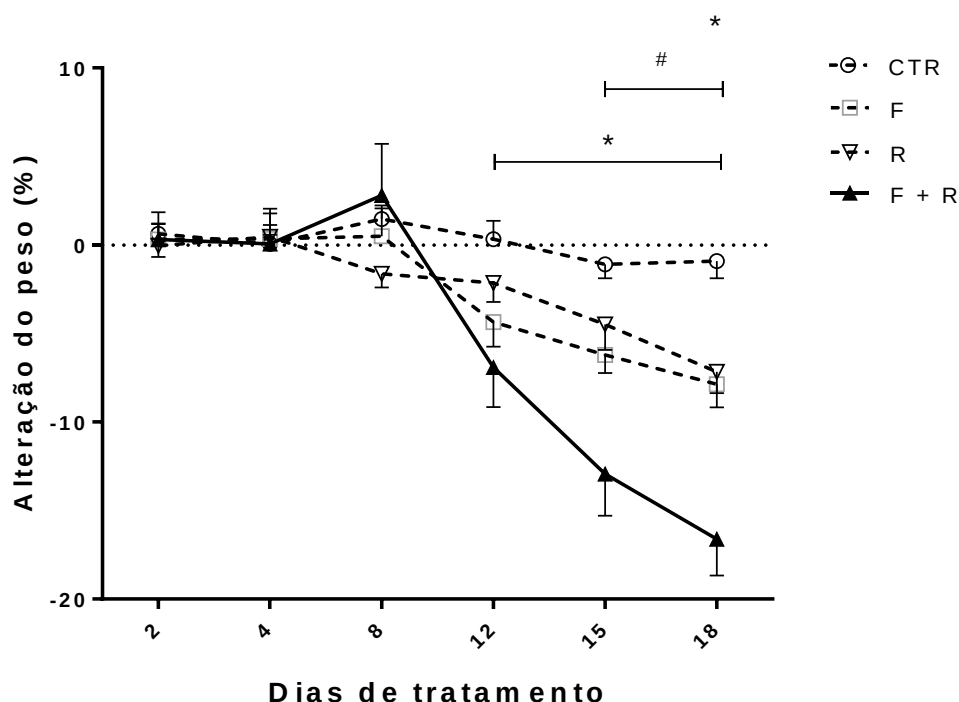


Figura 23: Efeito da administração 12 injeções de Fluoxetina (10 mg/kg) iniciada após 5 injeções de reserpina (0.1mg/kg) sobre a variação de peso dos animais. O grupo F + R apresentou diferença em relação ao grupo CTR ($p^* < 0,05$) a partir do dia 12 até o final do experimento e em relação ao grupo F a partir do dia 15 ($p^{\#} < 0,05$). O grupo F também apresentou diferença em relação ao grupo CTR a partir do dia 12 ($p^* < 0,05$). O grupo R apresentou diferença em relação ao CTR somente no dia 18 ($p^* = 0,0086$). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de pós-teste de Fisher's LSD. Os valores são expressos como média e E.P.M.

5.2.5 Imunorreatividade para TH

Em relação ao número de neurônios TH+ em VTA, ANOVA de uma via não evidenciou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 16) = 24,01$, $p = 0,8671$].

Para a SNpc, ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 16) = 14,12$, $p < 0,0001$] na expressão de neurônios TH+. Após realização do pós-teste de Fisher's LSD, foi observada diferença significativa entre os grupos F e R e o grupo CTR, com valores de $p = 0,0018$ e $p < 0,0001$, respectivamente. O grupo R apresentou também diferença em relação ao grupo F + R, com valor de $p = 0,0084$.

Em relação à Densidade Óptica Relativa no estriado dorsal, ANOVA de uma via também evidenciou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 16) = 15,75$, $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou diferenças significativas entre os grupos F e R e o grupo controle, com valores de $p = 0,0133$ e $p = 0,0005$, respectivamente. Esses mesmos grupos

também apresentaram diferença em relação ao grupo F + R, com valores de $p = 0,0033$ e $p = 0,0001$, respectivamente.

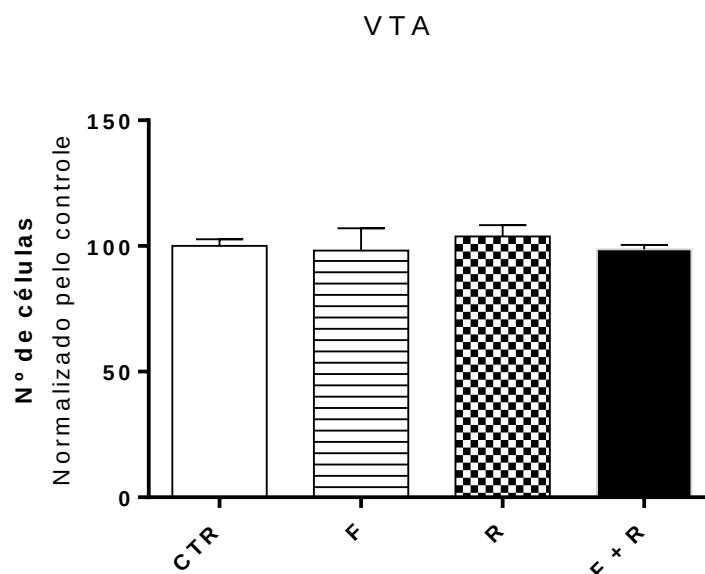


Figura 24: Relação entre o número de células TH+ em VTA e a administração de fluoxetina (10mg/kg) em animais com parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Não foi constatado efeito do tratamento para este parâmetro (ANOVA de uma via).

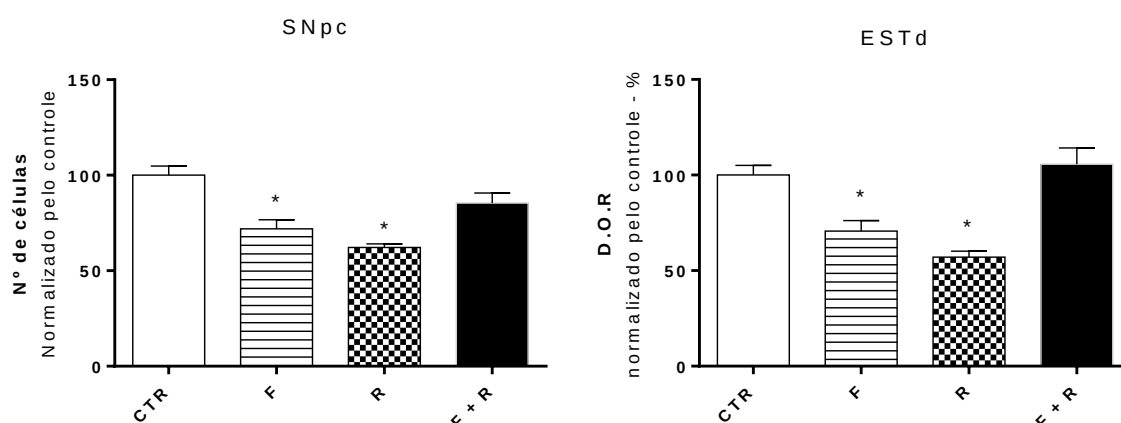


Figura 25: Efeito da administração de 12 injeções de Fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade para TH da SNpc e ESTd de animais com parkinsonismo após 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). O grupo F e o grupo R apresentam diminuição da expressão de células TH+ na SNpc e redução da D.O.R. no ESTd quando comparados ao grupo controle, com $p^* < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Fisher's LSD). Os valores são expressos por média e E.P.M e considerados significativos quando $p < 0,05$.

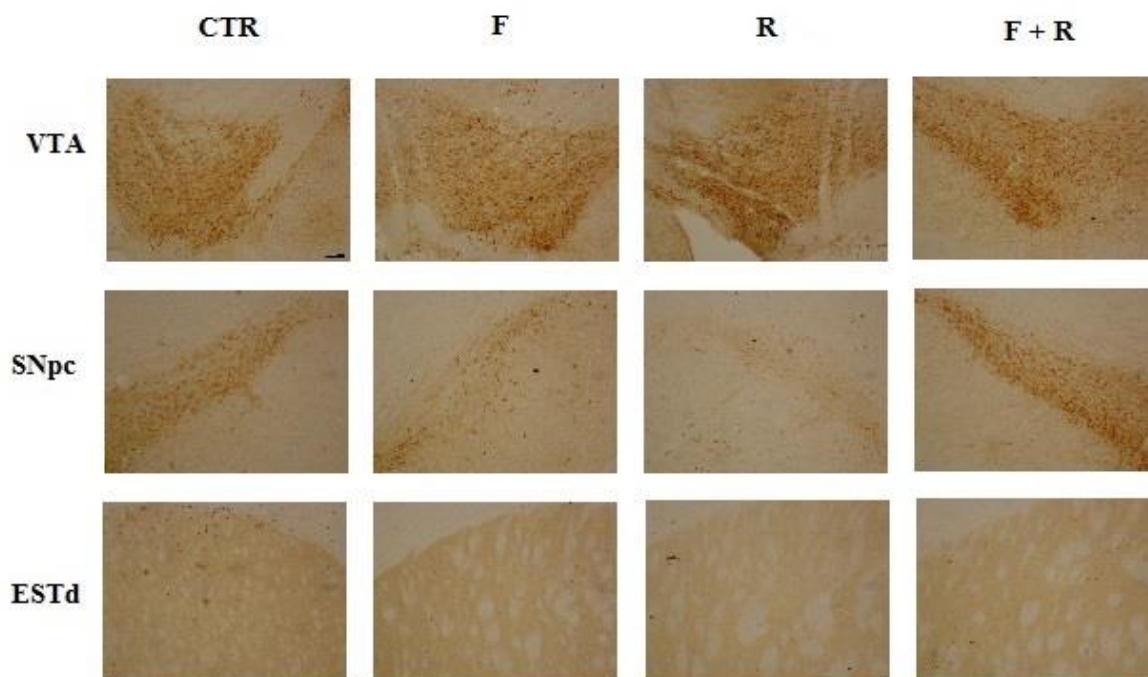


Figura 26: Imagens representativas do efeito da fluoxetina (10 mg/kg) número de células TH+ em VTA e na SNpc e da imunorreatividade para TH no ESTd dos animais tratados com 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Barra de escala 100 μ m.

5.2.6 Imunorreatividade para Serotonina

Para a D.O.R no núcleo dorsal da rafe, a ANOVA de uma via evidenciou efeito do tratamento (CTR, F, R e F + R) [$F(3, 16) = 19,54$, $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD evidenciou diferenças significativas entre o grupo F e os grupos CTR, R e F + R, com valores de $p = 0,0061$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente. Os grupos F + R e R apresentaram uma diminuição da D.O.R apenas marginalmente significativa em relação ao grupo CTR, com valores de $p = 0,0675$ e $0,694$, respectivamente.

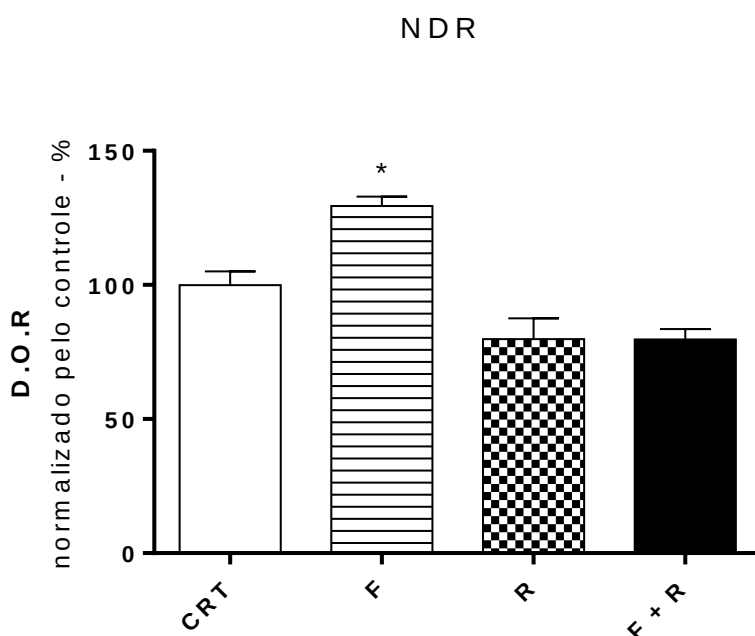


Figura 27: Alterações na D.O.R. do NDR de animais submetidos a parkinsonismo e tratados com 12 injeções de fluoxetina (10 mg/kg). O grupo F apresentou aumento da densidade óptica, com $p^* < 0,05$, enquanto os grupos F + R e R apresentaram diminuição apenas marginalmente significativa (ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher's LSD). Os valores são expressos por média e E.P.M e considerados significativos quando $p < 0,05$.

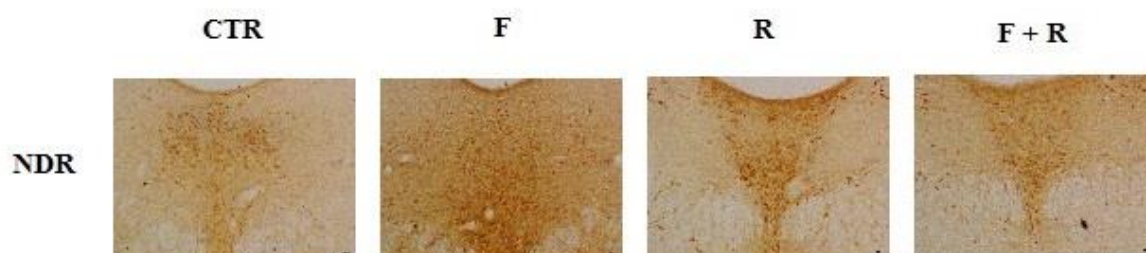


Figura 28: Imagens representativas do efeito da fluoxetina (10 mg/kg) na imunorreatividade do NDR de animais submetidos a 4 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Barra de escala: 100 μ m.

6. DISCUSSÃO

Visto que a fisiopatologia da DP não se limita apenas a alterações no sistema dopaminérgico, e que a rede serotoninérgica participa da regulação de núcleos mesencefálicos produtores de DA, este estudo teve o intuito de investigar a participação da 5-HT nas alterações cognitivas e motoras da DP. Para isso, foi utilizado um modelo baseado em pesquisas anteriores com roedores, com administração de baixas doses de reserpina, uma droga que se mostra capaz de provocar alterações não motoras e motoras, estresse oxidativo e depleção monoaminérgica de forma semelhantes às alterações observadas na DP (LEÃO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2013). Como forma de modulação das vias serotoninérgicas, foi utilizada a Fluoxetina, considerado o principal ISRS e droga de grande influência nessa rede neuronal. Os ISRS ganharam grande notoriedade no tratamento da depressão por terem uma baixa incidência de efeitos colaterais sérios (INDEN *et al.*, 2012). Uma vez que a depressão é um dos SNM mais comuns na DP, afetando cerca de 50% dos pacientes, ISRS são bastante utilizados para o tratamento da depressão (OHNO *et al.*, 2015; INDEN *et al.*, 2012; PORTUGUIEL *et al.*, 2015). Entretanto, a literatura apresenta dados aparentemente controversos no que diz respeito à ação desse medicamento por pacientes com DP e em modelos animais de parkinsonismo, ora tendo efeito protetor, ora efeito deletério. Cabe ressaltar que estas pesquisas se deram com outros modelos animais de parkinsonismo e com outras formas de administração do ISRS (SHARIFF *et al.*, 2015; MAHMOUDI *et al.*, 2011; PORTUGUIEL *et al.*, 2015; INDEN *et al.*, 2012).

6.1 Prejuízo motor na catalepsia

A catalepsia é definida como uma postura imóvel do animal, com as duas patas dianteiras permanecendo apoiadas sobre a barra. É esperado que os animais submetidos ao tratamento com reserpina apresentem aumento progressivo da latência na barra (BOYANER; RADOUCO-THOMAS, 1971). Esse teste tem sido bastante utilizado como forma de avaliação motora de hipocinesia em modelos animais da DP e tem permitido a investigação da natureza progressiva desse sinal motor nos animais, uma vez que pode ser repetido diariamente (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012).

No presente estudo, o teste de catapelsia do experimento 1 mostrou aumento da latência na barra para os animais do grupo F + R e os demais a partir do 6º dia de experimento – 48h após a terceira dose de reserpina. O uso concomitante da Fluoxetina foi capaz de antecipar o prejuízo motor causado pela reserpina, uma vez que este efeito não foi observado nos animais tratados apenas com o ISRS. Em concordância com essa observação, estudos apontam que o uso de ISRS se associa a inúmeros eventos adversos, como o aumento da alteração motora da DP (TATARA *et al.*, 2012; PORTUGIEL *et al.*, 2015). É importante ressaltar que os animais tratados com reserpina e veículo da fluoxetina (R) não apresentaram prejuízo motor nessa tarefa até 48h após a 4ª injeção, corroborando os dados apresentados em estudos anteriores com o mesmo modelo (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; LINS *et al.*, 2017).

No experimento 2, o teste de catalepsia revelou diferença entre o grupo F + R e o grupo R a partir do 12º dia de experimento, até o 16º dia. A partir do 18º dia de tratamento, a interação entre fluoxetina e reserpina não aumentou a hipocinesia provocada pela reserpina (R). O grupo R também apresentou alteração motora evidenciada pela maior latência na barra quando comparado ao grupo controle, a partir do 12º dia de experimento, tendo esse grupo se comportado de forma semelhante ao que foi relatado por Santos *et al.* (2012), no qual essas alterações foram observadas a partir do 14º dia de experimento. Essa pequena diferença na análise comportamental entre os estudos pode ser explicada por variações comportamentais naturais.

Os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico modulam inúmeras funções cerebrais e estão relacionadas à fisiopatologia da ansiedade e distúrbios afetivos e motores. Os ISRS bloqueiam o transportador de 5-HT e consequentemente aumentam a sinalização serotoninérgica. Esta sinalização pode causar efeitos colaterais semelhantes aos da diminuição da sinalização da DA, como acatisia, anedonia e sintomas extrapiramidais (MORELLI, *et al.*, 2011). As funções motoras extrapiramidais são controladas principalmente pelo sistema dopaminérgico, mas são moduladas por vários mecanismos serotoninérgicos. O bloqueio de receptores 5-HT_{2A/2C} reduz sintomas extrapiramidais, enquanto que a ativação de receptores 5-HT_{1A} no córtex, no estriado e nos núcleos da base reduz esses sintomas. Portanto, a ativação do sistema serotoninérgico por meio do uso de um ISRS pode potencializar esses sintomas via bloqueio de receptores 5-HT_{1A} ou ativação de 5-HT_{2A/2C} (TATARA *et al.*, 2012). Ainda, sabe-se que a liberação de DA na via nigroestriatal é negativamente regulada pela ativação de receptores 5-HT₂ localizados nas terminações nervosas dopaminérgicas do

estriado, tendo os antagonistas seu efeito antiparkinsoniano pela modulação dessa via (OHNO *et al.*, 2015).

O aumento da sinalização 5-HT pelo bloqueio crônico do seu transportador reduz o aporte de DA para liberação no estriado. Há indícios de que esse bloqueio crônico pode depletar parcialmente os níveis vesiculares de DA. Essa depleção seria explicada pelo efeito “*crowding-out*”: após bloqueio de 5-HTT, o DAT passa a captar moléculas de 5-HT para os neurônios dopaminérgicos (MORELLI, *et al.*, 2011).

Os ISRS inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica. Esta seletividade, que explica a redução no perfil de efeitos colaterais desses medicamentos, pode aumentar o risco de interação com outras substâncias que afetem a transmissão serotoninérgica, levando ao aparecimento de sintomas que são frequentemente descritos como síndrome serotoninérgica: alterações cognitivas e comportamentais (agitação, hipomania e confusão), alterações autonômicas (febre, diarreia, alterações na pressão arterial) e neuromusculares (tremores, incoordenação e hiperreflexia) (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Além das possíveis interferências no sistema de modulação da atividade dopaminérgica via ativação de receptores 5-HT, outro mecanismo de ação da fluoxetina neste modelo animal poderia se dar pelo aumento do estresse oxidativo causado pelo aumento da degradação da 5-HT não recaptada pelo VMAT bloqueado por ação da reserpina, uma vez que o estudo de Lima *et al.* (2013) mostra que indução aguda de parkinsonismo com reserpina não causou alteração dos níveis de TH, mas causaram prejuízo motor, o que leva a acreditar que os efeitos da reserpina não são causados apenas pelas alterações nos neurotransmissores em si, mas também pelo estresse oxidativo (ABÍLIO *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

6.2 Redução da atividade espontânea no campo aberto

O teste de campo aberto tem sido largamente utilizado para avaliar tanto a atividade motora (ANDRADE *et al.*, 1987) quanto o comportamento do tipo ansioso (ZHANG *et al.*, 2017) em modelos animais no estudo da DP (POTHAKOS; KURZ; LAU, 2009; KUAN; ZHAO; BARKER, 2008; WINNER *et al.*, 2009).

No experimento 1, a análise da atividade no campo evidenciou diferença significativa entre o grupo F + R e os demais grupos, em relação à distância total percorrida. Neste experimento, o grupo R também apresentou diferença na medição da distância total

percorrida em relação ao grupo CTR, porém em menor amplitude do que a observada no grupo F + R, o que evidencia a ação da fluoxetina de potencializar o efeito da administração da reserpina também nesse parâmetro. Cabe ressaltar que essa alteração observada no grupo R possivelmente seja resultado de um comportamento do tipo ansioso, e não a um prejuízo motor, uma vez que a avaliação deste grupo no teste de catalepsia não apontou alteração motora. Outros parâmetros avaliados para medição de comportamento tipo ansioso foram o número de entradas no centro e o número de rearing. Os grupos F + R e R apresentaram diminuição da exploração do campo aberto, com menores valores de rearing e entradas no centro, quando comparados ao grupo controle total, mas sem diferença entre si.

No experimento 2, foram realizadas duas avaliações no campo aberto, uma 48h após a 4ª e outra 48h após 10ª injeções de reserpina. Na primeira avaliação, ainda não havia sido iniciada a administração do ISRS e, portanto, havia apenas o grupo controle e o grupo reserpina. Os achados dessa avaliação após a 4ª injeção são compatíveis com as evidências do experimento 1, com alteração da distância percorrida, número de rearing e tempo de rearing. Essas alterações podem também ser explicadas como resultado da diminuição da exploração do aparato, uma vez que, neste mesmo momento do experimento 2, este grupo também não mostrou alteração motora no teste de catalepsia. Da mesma forma, a segunda avaliação do teste de campo aberto do experimento 2, realizado após a 10ª injeção, apresentou resultados em concordância com o que foi observado no teste de catalepsia realizado nesse mesmo período: os grupos F + R e R apresentaram diferença em relação ao grupo controle, mas não entre si.

Um dos parâmetros utilizados para avaliação comportamental no teste de campo aberto é a exploração da área central do campo, considerada um local mais aversivo, e, portanto, mais explorado quando o animal não apresenta comportamento do tipo ansioso. A literatura aponta que animais ansiosos tendem a ter medo de explorar o campo aberto e tendem a optar por um local considerado mais seguro, como o perímetro mais externo do aparato (ZHANG *et al.*, 2017). Outro quesito avaliado nos experimentos 1 e 2 foi o número de rearing, cuja diminuição é um indicador de menor exploração, fenômeno que pode ser revertido com o uso de compostos ansiolíticos (FEDOTOVA *et al.*, 2017).

Os dados observados nesse teste estão de acordo com o que aponta a literatura a respeito do modelo de parkinsonismo induzido pela reserpina em animais, que mostram que as alterações emocionais – como o comportamento do tipo ansioso – se apresentam em estágios iniciais da indução, antes mesmo do aparecimento do prejuízo motor (SANTOS *et*

al., 2013). Esses SNM estão possivelmente associados a alterações nas redes serotoninérgica (LOANE *et al.*, 2013). A escolha desse modelo de parkinsonismo nesta pesquisa se explica pela sua capacidade de fazer correspondência com a natureza progressiva da DP. Isto permite a avaliação de cada fase da progressão da doença sem a interferência das disfunções motoras severas encontradas em modelos agudos de indução de parkinsonismo que utilizam comumente uma única administração da droga em dose capaz de induzir em pouco tempo os SM (PORTUGIEL *et al.*, 2015).

A investigação sobre o papel da 5-HT na ansiedade foi iniciada após a observação de que antagonistas serotoninérgicos faziam efeitos similares aos dos ansiolíticos benzodiazepínicos (que diminuem a atividade de neurônios serotoninérgicos), acrescentando subsídios que favorecem a teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, que atribui à 5-HT um papel ansiogênico (PINHEIRO *et al.*, 2002).

A neurotransmissão por 5-HT desempenha um importante papel nos sintomas SNM da DP e a degeneração da via nigroestriatal resulta em disfunções centrais de 5-HT, como a diminuição cortical de 5-HT e alterações em vários subtipos de receptores serotoninérgicos. Os receptores 5HT1A são tanto expressos em neurônios pré-sinápticos dos núcleos da rafe quanto são os principais receptores pós-sinápticos de neurônios do sistema límbico e de outras regiões envolvidas na ansiedade. A atividade dos neurônios dessas regiões é negativamente regulada pela ativação de receptores 5HT1A pré e pós-sinápticos. Por isso, esses receptores estão relacionados tanto à patogênese quanto ao tratamento da ansiedade (HUI *et al.*, 2014).

Como já mencionado, a fluoxetina é um ISRS utilizado amplamente para tratamento de transtornos de humor como depressão e ansiedade. No entanto, apesar de sua eficiência terapêutica, essa droga apresenta um efeito agudo ansiogênico paradoxal e que esta ação se deve ao aumento súbito da 5-HT na fenda sináptica. Por outro lado, outros estudos levam a entender que o efeito ansiogênico não seria resultado da administração do ISRS em si, mas que este medicamento estimularia o eixo HPA em situações de estresse do animal. (GOMEZ; GARCÍA-GARCÍA, 2017).

Em ambos os experimentos desta pesquisa, a fluoxetina por si só não foi capaz de estimular o comportamento do tipo ansioso na avaliação do tempo de rearing, nº de entradas no centro e tempo de permanência no centro – exceto aumento apenas no número de rearing no experimento 2. Essas observações levam à hipótese de que o comportamento ansioso observado nos grupos F + R e R seja atribuído à reserpina, uma vez que não foi observada diferença entre esses grupos.

6.3 Aumento do tremor oral e dos movimentos orofaciais

Os movimentos de mandíbula podem ser definidos como movimentos verticais e rápidos, que se assemelham à mastigação e que, no entanto, não são direcionados ao alimento ou a nenhum outro estímulo em particular, sendo considerados um modelo animal de discinesia (SALANOME *et al.*, 1998). Esses movimentos são causados por mecanismos semelhantes aos que induzem o parkinsonismo, como neurotoxinas, depleção farmacológica de DA ou o antagonismo desse neurotransmissor.

Esses movimentos de mandíbula podem ser descritos como “mastigação” espontânea, produzida por deflexão vertical da mandíbula, sem que esta esteja direcionada diretamente a algum estímulo, e é mostrado em estudos que esses sintomas podem ser induzidos por várias condições, incluindo drogas neurolépticas, depleção de DA, antagonistas dopaminérgicos e colinomiméticos (SALANOME *et al.*, 1998).

No experimento 1, foi observado tremor oral nos animais do grupo F + R, com diferença estatística em relação aos demais grupos, sem alterações nos movimentos de mandíbula. O grupo tratado apenas com reserpina não apresentou diferença quanto ao tremor e movimentos de mandíbula quando comparado ao grupo controle total.

No experimento 2, também foram realizadas duas avaliações dos movimentos orofaciais em momentos distintos: 48h após a 5ª injeção de reserpina (11º dia de experimento) e 48h após a 9ª injeção de reserpina (19º dia de experimento). Na primeira avaliação, os animais do grupo R não apresentaram alterações orofaciais, enquanto o grupo F + R apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos para tremor orofacial e movimentos de mandíbula. Na segunda avaliação dos movimentos orofaciais – após a 9ª injeção de reserpina – os animais do grupo F + R continuaram a apresentar diferença estatística em relação ao grupo R em relação aos movimentos de mandíbula e tremor orofacial. Nesse ponto, o grupo R também apresentou aumento dos movimentos de mandíbula em relação ao controle total, mas de forma menos intensa do que o aumento observado nos animais que fizeram uso concomitante do ISRS. Cabe ressaltar que, o primeiro teste do experimento 2, os animais do grupo F + R haviam recebido apenas 2 injeções de fluoxetina. Mesmo assim, esse curto tratamento com o ISRS foi capaz de antecipar o surgimento dos movimentos de mandíbula e também o tremor orofacial que é observado na indução de

parkinsonismo por reserpina – efeito que não foi observado pelo tratamento apenas com fluoxetina em nenhum momento do experimento.

O modelo de movimentos trêmulos de mandíbula é um modelo de tremor em roedores bastante validado na literatura e pode ser induzido por depleção farmacológica e neurotóxica estriatal de DA, antagonismo dopaminérgico – condições associadas ao surgimento de parkinsonismo em humanos (COLLINS-PRAINO *et al.*, 2013). Além disso, a indução de discinesia oral é descrita na literatura como efeito da administração de reserpina (LEAL *et al.*, 2016).

Os resultados encontrados neste experimento para o grupo R são semelhantes aos descritos em estudo prévio com modelo de indução de parkinsonismo por reserpina: o surgimento dos movimentos orofaciais, como movimentos de mastigação, que só foram observados a partir do 21º dia de tratamento (FERNANDES *et al.*, 2012).

A análise dos dois experimentos mostra que a administração concomitante da fluoxetina nos animais que receberam reserpina foi capaz tanto de antecipar as alterações causadas pela reserpina, quanto ampliar a magnitude desses sintomas. Essa interação pode ser explicada por um possível fenômeno de modulação negativa das vias serotoninérgicas sobre a atividade dopaminérgica, já diminuída pela ação da reserpina.

Outra possível causa para esse efeito da fluoxetina pode ser devido à ativação de receptores 5HT_{2A/2C}, uma vez que a discinesia oral parece ser modulada por esses receptores, já que o uso de um antagonista foi capaz de suprimir os sintomas (PORDUGIEL *et al.*, 2015). Outro dado que fortalece a possibilidade de envolvimento de outras redes além da dopaminérgica é que o estudo de Sussman *et al.* (1997) observou que a discinesia oral provocada pela reserpina não desapareceu mesmo depois do restabelecimento da dopamina no estriado.

6.4 Redução de peso corporal

No experimento 1, foi observada diminuição do peso corporal dos animais tratados com F + R em relação aos grupos CTR e R, mas não em relação ao grupo tratado apenas com fluoxetina (F). Este grupo também apresentou significativa perda de peso quando comparado com os grupos CTR e R. O grupo R não mostrou perda ponderal significativa nesse primeiro experimento. Esses dados apontam que, no experimento 1, a perda de peso possivelmente foi

resultante apenas da terapia com o ISRS, não sendo alterado pelas injeções de reserpina até então.

No experimento 2, as alterações ponderais foram observadas a partir do 12º dia, após 4 injeções de fluoxetina. A partir desse ponto, os grupos F + R e F apresentaram diferença em relação ao grupo controle total, e diferença entre esses dois grupos foi observada a partir do 15º dia de experimento. O grupo R apresentou perda ponderal significativa em relação ao grupo CTR somente no 18º dia. Essas observações mostram que a reserpina por si só foi capaz de provocar perda ponderal após 9 injeções e que, apesar de a fluoxetina causar perda de peso em pouco tempo depois de sua administração, esse feito foi potencializado pela administração concomitante de reserpina, a partir do 15º dia de experimento.

Além dos SM clássicos, os pacientes com DP podem sofrer de vários transtornos alimentares. Estes transtornos incluem disfunções na mastigação e na deglutição e estão presentes em cerca de 50% dos pacientes, e a morte por pneumonia – considerada a principal causa de morte (40.9%) – parece estar relacionada a estes transtornos alimentares (NAKAMURA *et al.*, 2013).

A perda de peso em doenças neurodegenerativas é frequentemente observada e interfere no prognóstico. Pacientes com um histórico médico mais longo da doença apresentam maior perda de massa corporal, que pode resultar do processo da doença em si ou de causas secundárias como depressão, disfagia ou mesmo efeito colateral de medicamentos. Entretanto, há a possibilidade do efeito protetor do tratamento da DP, pois o tratamento adequado do tremor e da rigidez no início da doença poderia diminuir o consumo energético (TSUGE *et al.*, 2016).

Em relação ao uso dos ISRS, a literatura mostra dados conflitantes, ora mencionando o ganho de peso com o uso desses medicamentos, ora a perda de peso. Entretanto, o ganho de peso em alguns casos pode ser explicado pelo aumento do consumo de carboidratos em pacientes recuperados da depressão. Ainda, há dados que mostram perda inicial de peso, com posterior ganho com a continuidade do uso (ZHANG *et al.*, 2017; AGGARWAL *et al.*, 2016).

No presente experimento, foi observada pequena, mas significativa alteração de peso nos animais já nos primeiros dias dos experimentos, enquanto no estudo de Aggarwal e colaboradores, a diferença foi observada apenas após 4 semanas de uso da fluoxetina a 10mg/kg, também em ratos Wistar. Entretanto, é relevante considerar que os ratos testados nos dois experimentos do presente estudo eram animais de idade mais avançada, e

possivelmente mais sensíveis aos efeitos adversos dos ISRS, como náuseas, dor abdominal e anorexia, efeitos que podem ter precipitado a perda de peso (BRASIL; BELISÁRIO FILHO, 2000). Além disso, estudos mostram que o efeito antidepressivo da fluoxetina é idade-dependente, e também depende da plasticidade e neurogênese, sendo os cérebros mais jovens muito mais plásticos (ARNDT; PETERSON; CAIN, 2015). Da mesma forma, uma possível causa para o efeito rápido da fluoxetina na perda de peso nestes experimentos é a alteração da resposta pelo envelhecimento dos animais, causando rápida perda de peso.

6.5 Alterações imunohistoquímicas para TH e 5-HT

No primeiro experimento, foi observado efeito da administração da fluoxetina na diminuição expressão da TH no ESTd dos animais do grupo F e F + R e aumento da D.O.R para 5-HT na rafe dos animais desses mesmos grupos. Para o grupo R, não foi observado efeito do tratamento mais curto na expressão de TH em nenhuma das áreas estudadas. Os dados corroboram o trabalho de Freitas *et al.* (2016), no qual não se observaram alterações para TH após 4 injeções de reserpina. Entretanto, o tratamento com reserpina concomitante com a fluoxetina não impediu a elevação da 5-HT. Os dados do experimento mais curto foram proporcionais quando se compara o aumento da imunorreatividade para serotonina no NDR e uma correspondente diminuição da expressão da TH no ESTd dos animais tratados com fluoxetina. Uma das possíveis causas para esse efeito seria a regulação da expressão da DA através do aumento da sinalização serotoninérgica (OHNO *et al.*, 2015; MORELLI, *et al.*, 2011). Já uma possível causa para que não tenha ocorrido aumento da TH na presença da diminuição da 5-HT do grupo R pode ser os efeitos deletérios agudos do tratamento com reserpina.

Cabe frisar que, no experimento 2, os animais foram tratados por um período maior com a reserpina (10 injeções) e receberam também mais doses de fluoxetina (12 injeções). Alguns dos efeitos do tratamento na imunorreatividade para TH e serotonina foram relativamente semelhantes aos encontrados no experimento anterior, e outros efeitos significativamente distintos. O grupo F continuou a apresentar elevação da D.O.R na rafe e diminuição da expressão da TH no ESTd e, também, passou a apresentar diminuição do número de células TH+ na SNpc. O grupo tratado apenas com reserpina passou a apresentar diminuição de células TH+ na SNpc e da imunorreatividade para TH no ESTd (semelhante aos resultados de Santos *et al.*, 2013), mas sem efeito significativo sobre a expressão da 5-

HT na rafe – apenas uma diminuição marginal da D.O.R nessa área. Uma hipótese para a justificção desse resultado seria a ação de mecanismos compensatórios da rafe que gerariam maior resistência aos efeitos deletérios dessa administração mais prolongada da reserpina, uma vez que, no experimento 1, foi observado o efeito mais precoce de diminuição da D.O.R para 5-HT nesse grupo e no experimento 2, apenas um efeito marginal de diminuição. Cabe comparar que, no experimento mais extenso (exp. 2), o tratamento apenas com a fluoxetina continuou a aumentar a expressão da 5-HT na rafe (grupo F), mas com a média do grupo ligeiramente inferior (134,6 para o 1º experimento e 129,4 para o 2º), o que indica a possibilidade de diminuição da intensidade desse efeito da fluoxetina com a repetição das doses. O grupo que iniciou a fluoxetina após a 4ª dose de reserpina (F + R) não apresentou aquele mesmo efeito de níveis mais altos da expressão de 5-HT observados no experimento 1, possivelmente também pela diminuição da intensidade do efeito da fluoxetina, somado ao efeito deletério da reserpina, embora não tenha apresentado redução significativa da D.O.R para serotonina. Outra característica peculiar desse segundo experimento foi que o tratamento concomitante de F + R impediu a diminuição tanto do número de células TH+ na SNpc quanto da imunorreatividade para TH no ESTd observadas nos grupos F e R.

Uma pesquisa recente observou redução da TH no ESTd de animais após a 15ª injeção de reserpina e na SNpc apenas 15 dias após a última injeção (LEÃO *et al.*, 2017). Interessante ressaltar que essa diferença de tempo quanto ao surgimento das alterações na expressão da TH entre o ESTd e a SNpc indica uma via da depleção que se estende das fibras ao núcleo. De forma semelhante, foi observado na presente pesquisa alterações mais precoces no ESTd resultantes da terapia com o ISRS: diminuição da TH nessa área, antes do surgimento das alterações na SNpc observadas no grupo F.

Embora esta pesquisa tenha sido realizada com apenas 10 doses de reserpina, é importante frisar que existe a possibilidade de nossos animais serem mais sensíveis aos efeitos dos tratamentos devido à idade.

Considerando que a literatura aponta que os SM decorrentes do tratamento com reserpina surgem antes mesmo das alterações da TH, os dados desta pesquisa também fortalecem a possibilidade de que esses sintomas não sejam resultantes necessariamente da alteração nos níveis dos neurotransmissores em si, uma vez que os animais do grupo F apresentaram alterações na imunorreatividade para TH e 5-HT sem apresentar alteração sintomatológica, enquanto os animais tratados com F + R apresentaram sinais compatíveis

com as características padronizadas nos modelos animais de parkinsonismo (hipocinesia, discinesia oral, entre outras). Outro dado que apoia essa hipótese é um dos resultados da pesquisa de Leão *et al.*, 2017, em que animais tratados com 15 injeções reserpina, após a retirada do tratamento por 15 dias, apresentaram recuperação de alguns SM (alteração na locomoção espontânea, discinesia oral e hipocinesia), ao mesmo tempo que apresentaram diminuição da TH na SNpc. Ainda, utilizando esse mesmo modelo de indução, Santos *et al.*, 2013, observaram recuperação da função motora após a retirada da reserpina, ainda na presença de alterações no número de células TH+ da SNpc. Uma das possibilidades para explicar a causa do surgimento dos SM seria o desenvolvimento do estresse oxidativo causado pela reserpina. Esse estresse oxidativo em modelo de parkinsonismo foi descrito na pesquisa de Fernades *et al.*, em 2012, com o aumento da peroxidação lipídica estriatal nos animais tratados com 10 injeções de reserpina (0,1 mg/kg). Também, outra pesquisa com induções agudas de reserpina mostrou relação entre discinesia e o estresse oxidativo (ABÍLIO *et al.*, 2003).

Outra possível causa para a instalação dos SM nos grupos tratados com reserpina que não as alterações na imunorreatividade para TH seria o aumento da resposta inflamatória. Já é conhecida a participação da neuroinflamação na etiologia das doenças neurodegenerativas, como a DP (CHEN; ZANG; HUANG, 2016), como a ativação de células da micróglia na SNpc em análises pós-morte de pacientes com DP (McGEER *et al.*, 1988). Outro fator que também corrobora essa hipótese é o achado de um estudo recente que mostrou que o exercício físico num modelo animal de parkinsonismo causou melhora da função motora sem alteração significativa da TH, mas com amortecimento da resposta inflamatória (CHURCHIL *et al.*, 2017).

Cabe lembrar que, nas análises de imunorreatividade, não foram observadas alterações em VTA. Uma possível explicação para esse resultado poderia ser a quantidade de astrócitos presentes nessa área. Essas células, que protegem os neurônios das ERRO, estão mais densamente presentes em VTA do que em outras áreas, tornando-a menos suscetível à degeneração (DAMIER *et al.*, 1993).

Também, além das alterações nos neurotransmissores 5-HT ou DA, esses resultados poderiam ser explicados pela modulação de algum outro circuito neuronal. Já é conhecido que a Doença de Parkinson não envolve apenas alterações dopaminérgicas, mas a função colinérgica também está afetada (BOHNEN *et al.*, 2011), com alta ligação a receptores nicotínicos no estriado, SNpc e tálamo (COURT, CLEMENTI, 1995), além de

alterações glutamatérgicas (PLAITAKIS; SHASHIDHARAN, 2000). Uma das hipóteses para explicar os resultados desta pesquisa é que as alterações na sinalização serotoninérgica devido ao tratamento com fluoxetina podem ter modulado a sinalização de neurotransmissores como a acetilcolina e glutamato (OFEK *et al.*, 2012; GARCÍA-COLUNGA; MILEDI, 1999; BARYGIN *et al.*, 2017) e outros.

7. CONCLUSÃO

A administração de fluoxetina causou tanto a antecipação como a exacerbação das alterações motoras causadas pela reserpina, evidenciadas nas atividades de catalepsia e na avaliação dos movimentos orofaciais. A redução do peso corporal também foi observada com maior intensidade nos animais com tratamento por fluoxetina e reserpina, quando comparada à perda de peso causada pela fluoxetina ou reserpina sozinhas. As alterações motoras provocadas pelo tratamento com fluoxetina e reserpina simultaneamente não tiveram correlação com alterações imunohistoquímicas para TH. Entretanto, são necessários novos estudos para maior esclarecimento da interação entre o sistema serotoninérgico e as alterações motoras e não motoras desse modelo de parkinsonismo.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. C.; ARAÚJO, C. C. S.; BERGAMO, M.; CALVENTE, P. R. V.; D'ALMEIDA, V.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. 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, 2003, p.109–14.
- AGGARWAL, A.; JETHANI, S. L.; ROHATGI, R. K.; KALRA, J. Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors (SSRIs) Induced Weight Changes: A Dose and Duration Dependent Study on Albino Rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, 2016.
- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Perspectives on disease**, v. 12, n. 10, 1989.
- ANDRADE, L. A. F.; LIMA, J. G. C.; TUFIK, S.; BERTOLUCCI, P. H. F.; CALINI, E. A. Rem sleep deprivation in an experimental model of Parkinson's disease. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 45, n. 3, 1987.
- ARDNT, D. L.; PETERSON, C. J.; CAIN, M. E. Differential Rearing Alters Forced Swim Test Behavior, Fluoxetine Efficacy, and Post-Test Weight Gain in Male Rats. **Plos One**, v. 10, n. 7, 2015.
- BARYGIN, O. I.; NAGAEVA, E. I.; TIKHONOV, D. B.; BELINSKAYA, D. A.; VANCHAKOVA, N. P.; SHESTAKOVA, N. N. Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics. **Brain Research**, 2017, p. 58-66.
- BLESA, J.; TRIGO-DAMAS, I.; QUIROGA-VARELA, A.; JACKSON-LEWIS, V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. 91, 2015.
- BISPO, J. M. M. **Alterações motoras e imunohistoquímica da administração crônica de propionato de testosterona em ratos, de ambos os sexos, submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe.
- BOHNEN, N. I.; KAUFER, D. I.; IVANCO, L. S.; LOPRESTI, B.; KOEPPE, R. A.; DAVIS, J. G.; MATHIS, C. A.; MOORE, R. Y.; DeKOSKY, S. T. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 12, 2003, p. 1745-8.
- BOYANER, H. G.; RADOUCO-THOMAS, S. Effect of calcium on reserpine-induced catalepsy. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, n. 12, 1971, p. 974-5.
- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RUB, U.; DE VOS, R. A.; JANSEN STEUR, E.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, 2003, p. 197-211.
- BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas. Doença de Parkinson**. 2010.

BRASIL, H. H. A.; BELISÁRIO FILHO, J. F. Psicofarmacoterapia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, 2000.

BREEN, D. P.; EVANS, J. R.; FARREL, K.; BRAYNE, C.; BARKER, R. A. Determinants of delayed diagnosis in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 260, n. 8, 2013, p. 1978-81.

BUTER, T. C.; VAN DEN HOUT, A.; MATHEWS, F. E.; LARSEN, J. P.; BRAYNE, C. AARSLAND, D. Dementia and survival in Parkinson disease. **Neurology**, v. 70, 2008, p. 1017-22.

CALON, F.; MORISSETE, M.; GHRIBI, O.; GOULET, M.; GRONDIN, R.; BLANCHET, P. J.; BÉDARD, P. J.; DI PAOLO, T. Alteration of glutamate receptors in the striatum of dyskinetic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys following dopamine agonist treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, n. 1, 2002.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T.; 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature**, 1957.

CHARRON, G.; DOUDNIKOFF, E.; LAUX, A.; BERTHET, A.; PORRAS, G.; CANRON, M. H.; BARROSO-CHINEA, P.; LI, Q.; QIN, C.; NOSTEN-BERTRAND, M.; GIROS, B.; DELALANDE, F.; VAN DORSSELAER, A.; VITAL, A.; GOUMON, Y.; BEZARD, E. Endogenous morphine-like compound immunoreactivity increases in parkinsonism. **Brain**, v. 134, 2011.

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, 2006.

CHAUDHURI, K. R.; NAIDU, Y. Early Parkinson's disease and non-motor issues. **Journal of Neurology**, v. 255, 2008, p. 33-38.

CHAUDHURI, K. R.; YATES, L.; MARTINEZ-MARTIN, P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: time for a comprehensive assessment. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 5, n. 4, 2005, p. 275-83.

CHEN, W. W.; ZHANG, X.; HUANG, W. J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, 2016, p. 3391-6.

CHURCHIL, M. J.; PFLIBSEN, L.; SCONCE, M. D.; MOORE, C.; KIM, K.; MESHUL, C. K. Exercise in an animal model of Parkinson's disease: motor recovery but not restoration of the nigrostriatal pathway. **Neuroscience**, v. 359, p. 224-247.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Aging and Parkinson's Disease: different sides of the same coin? **Movement Disorders**, 2017.

COLLINS-PRAINO, L. E.; PAUL, N. E.; LEDGARD, F.; PORDUGIEL, S. J.; KOVNER, R.; BAQI, Y.; MÜLLER, C. E.; SENATUS, P. B.; SALAMONE, J. D. Brain deep

stimulation of the subthalamic nucleus reverses oral tremor in pharmacological model of parkinsonism: interaction with the effects of adenosine A^{2A} antagonism. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, 2013, p. 2183-91.

COURT, J.; CLEMENTI, F. Distribution of nicotinic subtypes in human brain. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 9, p. 6-14.

DAMIER, P.; HIRSCH, E. C.; ZHANG, P.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 52, 1993, p. 1-6.

DE LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, 2006.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P.; BIGLAN, K. M.; HOLLOWAY, R. G.; KIEBURTZ, K.; MARSHAL, F. J.; RAVINA, B. M.; SCHIFITTO, G.; SIDEROWF, A.; TANNER, C. M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **The Official Journal of the American Academy of Neurology**, v. 68, n. 5, 2007, p. 384-6.

EL-GHAZALY, M. A.; SADIK, N. A. H.; RASHED, E. R.; ADB-EL-FATTAH, A. A. Neuroprotective effect of EGb7611 and low-dose whole-body g-irradiation in a rat model of Parkinson's disease. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 12, 2015, p. 1128-43.

FAHN, S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, 2003, p. 1-14.

FALUP-PECURARIU, C.; DIACONU, S. Sleep Dysfunction in Parkinson's Disease. **International Review of Neurobiology**, v. 133, 2017, p. 719-42.

FEDOTOVA, J.; AKULOVA, V.; PIVINA, S.; DRAGASEK, J.; CAPRNDA, M.; KRUZLIAK, P. Modifications of anxiety-like behavior in prenatally stressed male offspring with imbalance of androgens. **Americam Jounal of Translational Research**, v. 9, n. 3, 2017.

FEIJÓ, F. M.; BERTOLUCI, M. C.; REIS, C. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, 2010.

FERNANDES, V. S.; SANTOS, J. R.; LEÃO, A. H. F. F.; MEDEIROS, A. M.; MELO, T. G.; IZÍDIO, G. S.; CABRAL, A.; RIBEIRO, R. A.; ABÍLIO, V. C.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 231, 2012, 154-63.

FERRAZ, F. P.; AGUIAR, P. M. C.; FERRAZ, H. B.; BIDÓ, J. O.; BOUZA, A. A.; DE ANDRADE, L. A. F. Talatomia e Palidotomia estereotáxica com planejamento computadorizado no tratamento da doença de Parkinson. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 56, n. 4, 1998.

FLORES-BARRERA, E.; VIZCARRA-CHACÓN, B. J.; BARGAS, J.; TAPIA, D.; GALARRAGA, E. Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 29, 2011.

FOLTYNIE, T.; BRAYNE, C.; BARKER, R. A. The heterogeneity of idiopathic Parkinson's Disease. **Journal of Neurology**, v. 249, n. 2, 2002, p. 138-45.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **New English Journal of Medicine**, v. 251, n. 25, 1954.

FREITAS, C. M.; BUSANELLO, A.; SCHAFFER, L. F.; PEROZA, L. R.; KURM, B. N.; LEAL, C. Q.; CERETTA, A. P. C.; DA ROCHA, J. B. T.; FACHINETTO, R. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. **Psychopharmacology**, v. 233, 2016, p. 457-67.

FUJITA, M.; ICHISE, M.; ZOGHBI, S. S.; LIOW, J.; GHOSE, S.; VINES, D. C.; SANGARE, J.; LU, J.; CROPLEY, V. L.; IIDA, H.; KIM, K. M.; COHEM, R. M.; BARAJIMENEZ, W.; RAVINA, B.; INNIS, R. B. Widespread Decrease of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Parkinson's Disease. **American Neurological Association**, v. 59, n. 1, 2005.

GARCÍA-COLUNGA, J.; MILEDI, R. Blockage of mouse muscle nicotinic receptors by serotonergic compounds. **Experimental Physiology**, v. 84, n. 5, 1999, p. 847-64.

GIBB, W. R. G.; LEES, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 51, 1988, p. 745-52.

GOMEZ, F.; GARCÍA-GARCÍA, L. Anxiogenic-like effects of fluoxetine render adult male rats vulnerable to the effects of a novel stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 153, 2017, p. 32-44.

GRAYBIEL, A. M. Basal ganglia: New therapeutic approaches to Parkinson's disease. **Current Biology**, v. 6, n. 4, 1996.

GUGLIANDOLO, A.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models. **Current Research in Translational Medicine**, 2016.
HUI, Y. P.; WANG, T.; HAN, L. N.; LI, B. L.; SUN, Y. N.; LIU, J.; QIAO, H. F.; ZHANG, Q. J. Anxiolytic effect of prefrontal 5-HT_{1A} receptor activation in the hemiparkinsonian rat. **Behavioural Brain Research**, 2014.

HAAXMA, C. A.; BLOEM, B. R.; BORM, G. F.; OYEN, W. J.; LEENDERS, K. L.; ESHUIS, S.; BOOIJ, J.; DLUZEN, D. E.; HORSTINK, M. W. Gender differences in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 78, n. 8, 2007, p. 819-24.

HUOT, P.; SGAMBATO-FAURE, V.; FOX, S. H.; McCREARY, A. C. Serotonergic approaches in Parkinson's disease: translational perspectives, an update. **ACS Chemical Neuroscience**, 2017.

HUSE, D. M.; SCHULMAN, K.; ORSINI, L.; CASTELLI-HALEY, J.; KENNEDY, S.; LENHART, G. Burden of illness in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 20, n. 11, 2005.

INDEN, M.; ABE, M.; MINAMINO, H.; TAKATA, K.; YOSHIMOTO, K.; TOOYAMA, I.; KITAMURA, Y. Effect of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors via 5-HT_{1A} Receptors on L-DOPA-Induced Rotational Behavior in a Hemiparkinsonian Rat Model. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 119, 2012, p. 10-9.

JANKOVIC, J. Parkinson's Disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 79, n. 4, 2008, p. 368-76.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's Disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, 2015, p. 896-912.

KISH, S. J.; TONG, J.; HORNYKIEWICZ, O.; RAJPUT, A.; CHANG, L. J.; GUTTMAN, M.; FURUKAWA, Y. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. **Brain**, v. 131, 2008, p. 120-31.

KUAN, W. L.; ZHAO, J. W.; BARKER, R. A. The role of anxiety in the development of levodopa-induced dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease, and the effect of chronic treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 2, 2008, p. 279-93.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, 1998, p. 1044-53.

LEAL, P. C.; LINS, L. C. R. F.; GOIS, A. M.; MARCHIORO, M.; SANTOS, J. R. Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, 2016.

LEÃO, A. H. F. F.; SARMENTO-SILVA, A. J.; SANTOS, J. R.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long Standing Model. **Brain Pathology**, v. 25, p. 377-90, 2015.

LEÃO, A. H. F.; MEURER, Y. S. R.; SILVA, A. F.; MEDEIROS, A. M.; CAMPÊLO, C. L. C.; ABÍLIO, V. C.; ENGELBERTH, R. C. G. K.; CAVALCANTE, J. S.; IZÍDIO, G. S.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) Are Resistant to a Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease: Differences in Motor Behavior, Tyrosine Hydroxylase and α -Synuclein Expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2017.

LESSER, R. P.; FAHN, S.; SNIDER, S. R.; COTE, L. J.; ISGREEN, W. P.; BARRET, R. E. Analysis of the clinical problems in parkinsonism and the complications of long-term levodopa therapy. **Neurology**, v. 29, 1979.

LITVAN, I.; AARSLAND, D.; ADLER, C. H.; GOLDMAN, J. G.; KULISEVSKY, J.; MOLLENHAUER, B.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; TRÖSTER, A. I.; WEINTRAUB, D. MDS task force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Critical review of PD-MCI. **Movement Disorders**, v. 26, n. 10, 2011, p. 1814-24.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; FERRAZ, A. C.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. S. Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression

in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. **CNS & Neurological Disorders – Drug Targets**, v. 11, n. 4 2013, p. 359–68.

LINS, L. C. R. F.; SOUZA, M. F.; CINTRA, R. R.; MEDEIROS, K. A. A. L.; MACEDO-LIMA, M.; MORAES, S. Z. C.; ESTEVAM, C. S.; ALMEIDA, G. K. M.; SANTOS, S. L.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H.; SANTOS, J. R.; MARCHIORO, M. Attenuation of motor deficits by hydroethanolic extract of *Poincianella pyramidalis* in a Parkinson's disease model. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, 2017, p. 150-161.

LIU, S. B.; ZHAO, R.; LI, X. S.; GUO, H. J.; TIAN, Z.; ZHANG, N.; GAO, G. D.; ZHAO, M. G. Attenuation of reserpine-induced pain/depression dyad by gentiopicroside through downregulation of GluN2B receptors in the amygdala of mice. **Neuromolecular Medicine**, v. 16, 2014, p. 350-9.

LOANE, C.; BAIN, P.; BROOKS, D. J.; PICCINI, P.; POLITIS, M. Serotonergic loss in motor circuitries correlates with severity of action-postural tremor in PD. **Neurology**, v. 80, n. 20, 2013, p. 1850-5.

MAHMOUDI, J.; NAYEBI, A. M.; SAMINI, M.; REYHANI-RAD, S.; BABAPOUR, V. Bupirone improves the anti-cataleptic effect of levodopa in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 908-14, 2011.

MARKHAM, C. H.; CLARK, W. G.; WINTERS, W. D. Effect of Alpha-Methyldopa and reserpine in Huntington's Chorea, Parkinson's Disease and other movement disorders. **Life Sciences**, n. 9, 1963, p. 697-705.

MARTIN-MASTIDA, A.; PIETRACUPA, S.; PICCINI, P. Neuromelanin in parkinsonian disorders: an update. **International Journal of Neuroscience**, 2016.

McGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B. E.; McGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, 1988, p. 1285-91.

MORELLI, E.; MOORE, H.; REBELLO, T. J.; GRAY, N.; STEELE, K.; ESPOSITO, E.; GINGRICH, J. A.; ANSORGE, M. S. Chronic 5-HT Transporter Blockade Reduces DA Signaling to Elicit Basal Ganglia Dysfunction. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 44, 2011.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia dos antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, 1999.

NAKAMURA, S.; KAWAI, N.; OHNUKI, Y.; SAEKI, Y.; KORFAGE, J. A. M.; LANGENBACHG, G. E. J.; KITAYAMA, T.; WATANABE, M.; SANO, R.; TANNE, K.; TANAKA, K. Changes in activity and structure of jaw muscles in Parkinson's disease model rats. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 40, 2013, p. 205-13.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. **Parkinson's Disease in adults: diagnosis and management**. NG71. Methods, Evidence and Recommendations. 2017.

OFEK, K.; SCHOKNECHT, K.; MELAMED-BOOK, N.; HEINEMANN, U.; FRIEDMAN, A.; SOREQ, H. Fluoxetine induces vasodilatation of cerebral arterioles by co-modulating NO/muscarinic signaling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 16, n. 11, 2012, p. 2736-44.

OHNO, Y.; SHIMIZU, S.; TOKUDOME, K.; KUNISAWA, N.; SASA, M. New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 134, 2015, p. 104-21.

PAVLOU, M. A. S.; OUTEIRO, T. F. Epigenetics in Parkinson's Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2017, p. 363-390.

PETER, D.; JIMENEZ, J.; LIU, Y.; KIM, J.; EDWARDS, R. H. The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, 1994.

PLAITAKIS, A.; SHASHIDHARAN, P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 247, 2000, p. 1125-35.

PIRES, A. O.; TEIXEIRA, F. G.; MENDES-PINHEIRO, B.; SERRA, S. C.; SOUZA, N.; SALGADO, A. J. Old and New Challenges in Parkinson's Disease Therapeutics. **Progress in Neurobiology**, 2017.

PINHEIRO, G. A.; ALVES, S. H.; S.; MURCE, P. P.; A. P. M. CRUZ. Envolvimento dos Receptores 5-HT₂ da Amígdala nos Níveis de Ansiedade Induzidos pela Exposição de Ratos ao Labirinto em Cruz Elevado. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 18, n. 3, 2002, p. 329-35.

PIZANI, A.; FEZZA, F.; GALATI, S.; BATTISTA, N.; NAPOLITANO, S.; FINAZZI-AGRO, A.; BERNARDI, G.; BRUSA, L.; PIERANTOZZI, M.; STANZIONE, P. MACCARRONE, M. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 5, 2005.

PIROGOVSKY-TURK, E.; MOORE, R. C.; FILOTEO, J. V.; LITVAN, I.; SONG, D. D.; LESSIG, S. L.; SCHIEHSE, D. M. Neuropsychiatric predictors of cognitive decline in Parkinson's disease: a longitudinal study. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, 2016.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A.; LANG, A. E. Parkinson Disease. **Nature Reviews Disease Primers**, 2017.

POLITIS, M.; WU, K.; LOANE, C.; TURKHEIMER, F. E.; MOLLOY, S.; BROOKS, D. J. PICCINI, P. Depressive symptoms in PD correlate with higher 5-HTT binding in raphe and limbic structures. **Neurology**, v. 75, n. 21, 2010, p. 1920-7.

PORDUGIEL, S. J.; MILLIGAN, N. M.; YOHN, S. E.; PURCELL, L. J.; CONTRERAS-MORA, H.; CORREA, M.; SALAMONE, J. D. Fluoxetine administration exacerbates oral

tremor and striatal dopamine depletion in a rodent pharmacological model of parkinsonism. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 9, 2015.

POTHAKOS, K.; KURZ, M.; LAU, Y. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. **BMC Neuroscience**, v. 10, n. 6, 2009.

QI, Z.; MILLER, G. W.; VOIT, E. O. Computational systems analysis of dopamine metabolism. **Plos One**, v. 3, n. 6, 2008.

RICHARD, I. H.; KURLAN, R. A survey of antidepressant drug use in Parkinson's disease. Parkinson Study Group. **Neurology**, v. 49, n. 4, 1997, p. 1168-70.

SALAMONE, J.; BASKIN, P. Vacuous Jaw Movements Induced by Acute Reserpine and Low-Dose Apomorphine: Possible Model of Parkinsonian Tremor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 1, 1996, p. 179-83.

SALANOME, J. D.; MAYORGA, A. J.; TREVITT, J. T.; COUSINS, M. S.; CONLAN, A.; NAWAB, A. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. **Progress in Neurobiology**, v. 56, 1998, p. 591-611.

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, 2013.

SANTOS, J. R.; CUNHA, J. A. S.; DIERSCHNABEL, A. L.; CAMPÊLO, C. L. C.; LEÃO, A. H. F. F.; SILVA, A. F.; ENGELBERTH, R. C. G. J.; CAVALCANTE, J. S.; ABÍLIO, V. C.; IZÍDIO, G. S.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, 2013, p. 68-77.

SANTOS, J.R. **Estudo das Alterações Cognitivas, Motoras e Neuroquímicas em dois novos modelos progressivos da Doença De Parkinson**. 2012. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Departamento de Fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

SCOTT, B.; BORGMAN, A.; ENGLER, H.; JOHNELS, B.; AQUILONIUS, S. M. Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 102, 2000, p. 37-43.

SEIDEL, K.; MAHLKE, J.; SISWANTO, S.; KRÜGER, R.; HEINSEN, H.; AUBURGER, G.; BOUZROU, M.; GRINBERG, L. T.; WICHT, H.; KORF, H.; DEN DUNNEN, W.; RÜB, U. The Brainstem Pathologies of Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. **Brain Pathology**, v. 25, 2015, p. 121-35.

SELIKHOVA, M.; WILLIAMS, D. R.; KEMPSTER, P. A.; HOLTON, J. L.; LEES, A. J. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. **Brain**, v. 132, 2009, p. 2947-57.

SHARIFI, H.; NAYEBI, A. M.; FARAJNIA, S.; HADDADI, R. Effect of Buspirone, Fluoxetine and 8-OH-DPAT on Striatal Expression of Bax, Caspase-3 and Bcl-2 Proteins in

6-Hydroxydopamine-Induced Hemi-Parkinsonian Rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 4, p. 491-5, 2015.

SHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; CLARK, J. B.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 3, 1990, 823-7.

SILVA, R. H.; ABÍLIO, V. C.; TORRES-LEITE, D.; BERGAMO, M.; CHINEN, C. C.; CLARO, F. T.; CARVALHO, R. C.; FRUSSA-FILHO, R. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 132, n. 2, 2002, p. 171-7.

SLAUGHTER, J. R.; SLAUGHTER, K. A.; NICHOLS, D.; HOLMES, S. E.; MARTENS, M. P. Prevalence, Clinical Manifestations, Etiology, and Treatment of Depression in Parkinson's Disease. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 13, 2001, p. 187-96.

STRAUSS, C. V. A. **Efeitos da ativação de receptores dos tipos 5 HT1A e 5 HT 2A/2C do complexo amigdalóide sobre a modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico**. Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Psicobiologia). 2005. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

SUSSMAN, A. N.; TRAN-NGUYEN, L. T.; NEISEWANDER, J. L. Acute reserpine administration elicits long-term spontaneous oral dyskinesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 337, 1997, p. 157-60.

TATARA, A.; SHIMIZU, S.; SHIN, N.; SATO, M.; SUGIUCHI, T.; IMAKI, J.; OHNO, Y. Modulation of antipsychotic-induced extrapyramidal side effects by medications for mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 38, 2012, p. 252-9.

TEIXEIRA, A. M.; TREVISOL, F.; COLPO, G.; GARCIA, S. C.; CHARÃO, M.; PEREIRA, R. P.; FACHINETTO, R.; ROCHA, J. B.; BÜRGER, M. E. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: behavioral and antioxidant evaluations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, 2008, p. 465–72.

TSUGE, A.; KANEKO, S.; WATE, R.; OKI, M.; NAGASHIMA, M.; ASAYAMA, S.; NAKAMURA, M.; FUJITA, K.; SAITO, A.; TAKENOCHI, N.; KUSAKA, H. Weight loss in the early stage of progressive supranuclear palsy. **Brain and Behaviour**, 2016.

VAN DEN EEDEN, S. K.; TANNER, C. M.; BERNSTEIN, A. L.; LEIMPETER, A.; BLOCH, D. A.; NELSON, L. M. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. 11, 2003, p. 1015-22.

WANG, Y.; LIU, H.; DU, X.; ZHANG, Y.; YIN, G.; ZHANG, B.; SOARES, J. C.; ZHANG, X. Y. Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 41, 2017, p. 73-38.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 1, 2011.

WINNER, B.; DESPLATS, P.; HAGL, C.; KLUCKEN, J.; AIGNER, R.; PLOETZ, S.; LAEMKE, J.; KARL, A.; AIGNER, L.; MASLIAH, E.; BUERGER, E.; WINKLER, J. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 2, 2009, p. 543-52.

ZHANG, M.; LIU, Y.; ZHAO, M.; TANG, W.; WANG, X.; DONG, Z.; YU, S. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. **Journal of Headache and Pain**, 2017.

ZHANG, L.; WANG, X.; ZHAO, N.; WHANG, Y.; HU, X.; RAN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; YANG, R.; LI, Y. Neurochemical and behavioral effects of hypidone hydrochloride (YL-0919): A novel combined selective serotonin reuptake inhibitor and partial 5-HT_{1A} agonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 9, 2017, p. 769-80.

ZUO, L. J.; YU, S. Y.; HU, Y.; WANG, F.; PIAO, Y. S.; LIAN, T. H.; YU, Q. J.; WANG, R. D.; LI, L. X.; GUO, P.; DU, Y.; ZHU, R. Y.; JIN, Z.; WANG, Y. J.; WANG, X. M.; CHANG, P.; CHEN, S. D.; WANG, Y. Y.; ZHANG, W. Serotonergic dysfunctions and abnormal iron metabolism: Relevant to mental fatigue of Parkinson disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

ANEXO – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**ALTERAÇÃO MORFOLÓGICAS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM DOIS MODELOS PROGRESSIVOS DA DOENÇA DE PARKINSON**”, registrada com o nº 33/2016, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 14/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/12/2016, Término: 01/12/2017
Espécie/linhagem/raca	Rato heterogênico/Swiss
Nº de animais	140
Peso/Idade	250-550g / 6 a 10 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do DFS da UFS

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