



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

ROBERTA TEIXEIRA ROCHA ABRITTA

**REVERSIBILIDADE DAS ALTERAÇÕES MOTORAS E DA
TIROSINA HIDROXILASE EM UM MODELO
PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO EM RATOS**

SÃO CRISTÓVÃO – SE
2020

ROBERTA TEIXEIRA ROCHA ABRITTA

**REVERSIBILIDADE DAS ALTERAÇÕES MOTORAS E DA
TIROSINA HIDROXILASE EM UM MODELO
PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO EM RATOS**

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

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

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

A163r Abritta, Roberta Teixeira Rocha
Reversibilidade das alterações motoras e da tirosina
hidroxilase em um modelo progressivo de parkinsonismo em ratos
/ Roberta Teixeira Rocha Abritta ; orientador José Ronaldo dos
Santos. – São Cristóvão, SE, 2020.
64 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Parkinson, Doença de. 2. Dopamina. 3. Reserpina. 4. Modelos
animais em pesquisa. I. Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 612.8:616.858

ROBERTA TEIXEIRA ROCHA ABRITTA

**REVERSIBILIDADE DAS ALTERAÇÕES MOTORAS E DA
TIROSINA HIDROXILASE EM UM MODELO
PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO EM RATOS**

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

Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos (UFS)
Orientador (presidente da banca)

Prof. Dr. Marcos Aurélio de Moura Freire (UERN)
1º Examinador

Profa. Dra. Ywlliane da Silva Rodrigues Meurer (UFRN)
2º Examinador

Para meu amor...

“Os livros na estante já não tem mais tanta importância

Do muito que eu li, do pouco que eu sei

Nada me resta

A não ser a vontade de te encontrar (...)

Só pra ler no seu rosto

Uma mensagem de amor”

(Herbert Vianna, 1984)

AGRADECIMENTOS

Ao encerrar mais um ciclo em minha vida é chegada a hora de agradecer. E que alegria ao constatar que são muitas as pessoas a quem gostaria de agradecer, que felicidade em perceber quantas pessoas maravilhosas estiveram ao meu lado me dando ajuda, apoio, suporte. Inicialmente, sou grata a Deus por isso!

Agradeço a minha família, origem de tudo. Aos meus pais que desde muito cedo incentivaram o estudo e a busca pelo conhecimento de cada um de seus filhos. Obrigada pelos inúmeros esforços feitos para permitir a base necessária para chegar aqui. Obrigada aos meus irmãos que sempre me apoiaram e nunca duvidaram de mim.

Agradeço ao meu marido, grande entusiasta da vida acadêmica, pelo apoio irrestrito, pela ajuda nos textos, pelas formatações infinitas, pelas palavras que acalmam nos dias de ansiedade, por estar presente sempre.

Agradeço ao meu orientador Ronaldo pela compreensão, pelo apoio, pelo incentivo e acima de tudo pela amizade. Obrigada por todo o conhecimento técnico, pelas aulas tão agradáveis, pelas lições de como liderar uma equipe heterogênea e ainda assim unida, pelas reuniões das quintas-feiras sempre tão produtivas e divertidas, pelas conversas longas que abrangiam quase todo tipo de assunto... Você é um orientador incrível. Grata!

Agradeço à equipe LaNCE e LNFS, por tudo que aprendi e por todo o trabalho de equipe. O trabalho unido da equipe torna possível produzir o que jamais seria possível sozinhos. Esse trabalho não existiria sem vocês. Obrigada Katty, Auderlan, Marina, Thassya, Marcos, Edson, Thiago, João, Rodolfo, Heitor, Livia, Polly, Lima, Milena, Mylaine, Wesley, Isabela, Jana, Vanessa e Murilo.

Agradeço aos melhores colegas de disciplinas que poderia encontrar, vocês fizeram aqueles dias difíceis serem muito mais leves. Obrigada “turma mais legal”: João, Eline, Annanda, Luis André, Daniely, Maiara, Andreza, Felipe, Genivaldo, Ivana, Vinicius.

Agradeço aos professores da banca PROASA, pelas contribuições e pelo acompanhamento, assim como aos membros da banca de qualificação e defesa.

Agradeço aos docentes e corpo técnico do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela enorme contribuição para minha formação. Agradecimento especial a Renivan e a profa. Josi.

Agradeço à Universidade Federal de Sergipe, por todo suporte ao longo deste período.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa de caráter crônico e progressivo, caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos principalmente na substância negra parte compacta (SNpc). Múltiplos modelos animais procuram mimetizar as alterações comportamentais e fisiopatológicas da DP, cada um com vantagens e desvantagens. O modelo da Reserpina (RES), que mimetiza a natureza progressiva da DP, é baseado na administração repetida de 10 a 15 injeções com uma baixa dose ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) em ratos. Entretanto, a interrupção da administração de RES é acompanhada de uma recuperação das alterações observadas. O presente estudo teve como objetivo verificar se o tratamento prolongado com RES permite mimetizar a natureza progressiva e irreversível da DP. Foram utilizados 32 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos: Controle (CTR); Reserpina (RES); Controle e posterior período de abstinência (CTR.A); RES e posterior período de abstinência (RES.A). Todos os animais receberam 45 injeções s.c. de RES ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) ou veículo, uma a cada 48h. No dia 90, os animais dos grupos CTR e RES foram mortos por perfusão transcardíaca e os encéfalos submetidos a imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH), enquanto os animais dos grupos CTR.A e RES.A permaneceram no protocolo experimental por mais 30 dias, porém sem receber injeções. Ao longo do experimento os animais foram submetidos aos testes de catalepsia e avaliação de movimentos orais para avaliação da atividade motora. Os animais tratados com RES apresentaram alteração motora progressiva no teste de catalepsia a partir do dia 36 e alterações progressivas, a partir do dia 20, na avaliação dos movimentos orais, nos três parâmetros observados: 1- tremor oral, 2- protrusão de língua e 3-mastigação. Animais do grupo RES.A apresentaram reversibilidade das alterações motoras (catalepsia e movimentos orais) 30 dias após a interrupção do tratamento. A avaliação da imunorreatividade para TH mostrou que o tratamento com RES foi capaz de induzir redução do número de neurônios na SNpc e Área Tegmentar Ventral (VTA), além de uma redução na densidade óptica relativa no Estriado Dorsal (ED). O grupo RES.A apresentou recuperação da imunorreatividade para TH apenas em VTA. Em conjunto, os resultados encontrados evidenciaram que, após 45 injeções de RES, os animais apresentaram alterações motoras reversíveis, no entanto induziram um prejuízo irreversível na via nigroestriatal durante o período de avaliação.

Palavras-chave: modelos animais, reserpina, doença de Parkinson, dopamina

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive neurodegenerative disease, characterized by progressive loss of dopaminergic neurons, mainly in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Studies employing animal models have sought to mimic the progressive nature of behavioral and pathophysiology features of PD, each one with advantages and disadvantages. Reserpine (RES) model, which mimics the progressive nature of PD, is based on repeated administration of 10 to 15 injections with a low dose (0.1 mg.kg^{-1}) in rats. However, the interruption of the RES administration is accompanied by a recovery of the observed changes. The present study aimed to verify whether the prolonged treatment with RES allows to mimic the progressive and irreversible nature of PD. Thirty-two male Wistar rats were used, divided into 4 groups: Control (CTR); Reserpine (RES); Control and subsequent abstinence period (CTR.A); RES and subsequent abstinence period (RES.A). All animals received 45 subcutaneous injection of RES (0.1 mg.kg^{-1}) or vehicle, one every 48h. On day 90, animals from CTL and RES groups were killed by transcardiac perfusion and the brains were submitted to immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase (TH). Animals in groups CTR.A and RES.A remained in the experimental protocol for another 30 days, but without receiving injections. Throughout the experiment the animals were subjected to catalepsy tests and evaluation of oral movements to assess motor activity. Animals treated with RES showed progressive motor alteration in the catalepsy test from day 36 and progressive alterations, from day 20, in the evaluation of oral movements, in the three parameters observed: 1- oral tremor, 2- tongue protrusion and 3-chewing. Reserpine-treated rats showed reversibility of motor changes (catalepsy and oral movements) 30 days after treatment interruption. The evaluation of TH immunoreactivity showed the treatment with RES was able to induce a reduction in the number of neurons in the SNpc and Ventral Tegmental Area (VTA), besides reduction in the relative optical density in the dorsal striatum (ED). The RES.A group showed recovery of TH immunoreactivity only in VTA. The 45 injections of RES, despite showing reversible motor changes, induced irreversible damage in the nigrostriatal pathway. In conclusion, the results found showed that, after 45 injections of RES, the animals showed reversible motor changes, however they induced an irreversible damage in nigrostriatal pathway during the evaluation period.

Keywords: Animal models, Reserpine, Parkinson's disease, Dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos circuitos dos núcleos da base relacionados ao movimento.	23
Figura 2 - Metabolismo da dopamina.	31
Figura 3 - Mecanismos de dano celular em alguns modelos animais para DP.	33
Figura 4 - Delineamento experimental	38
Figura 5 - Representação ilustrativa do teste de catalepsia.	40
Figura 6 - Representação ilustrativa da avaliação de movimentos orais.	41
Figura 7- Efeito da administração repetida de reserpina sobre a variação do peso corporal.	44
Figura 8- Efeito da administração repetida de reserpina sobre alterações motoras no comportamento de catalepsia.	45
Figura 9 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de movimentos orais – tipo mastigação.	46
Figura 10 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de movimentos orais – tipo protrusão.	47
Figura 11 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de movimentos orais – tipo tremor.	48
Figura 12 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de células TH+ na SNpc.	49
Figura 13 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de células TH+ em VTA.	50
Figura 14 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre a imunorreatividade para TH no Estriado Dorsal.	51
Figura 15 – Imagens ilustrativas do efeito da administração repetida de reserpina sobre a imunorreatividade para TH na SNpc, VTA e Estriado Dorsal	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estágios clínicos da DP pela escala de Hoehn e Yahr e Hoehn e Yahr modificada.	19
Tabela 2- Comparação das características humanas na DP com os modelos animais.. ..	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ABC	Complexo Avidina biotina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX1	Ciclo-oxigenase 1
COX2	Ciclo-oxigenase 2
CTR	Grupo experimental controle
CTR.A	Grupo experimental controle submetido a abstinência
DA	Dopamina
DAB	3- Diaminobenzidina
DAT	Transportador de dopamina na membrana
DOR	Densitometria óptica relativa
DP	Doença de Parkinson
ED	Estriado dorsal
EPM	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido Gamaminobutírico
GPI	Globo pálido parte interna
GPe	Globo pálido parte externa
ICV	Intracérebro-ventricular
LC	Locus cerúleo

LDOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina ou levodopa
LNFS	Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal de Sergipe
LSD	Least Significant Difference
MAO	Monoamina oxidase
MAO-B	Monoamina oxidase B
MOF	Movimentos orais
MPP	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
PB	Phosphate buffered – tampão fosfato
PBS	Phosphate buffered saline – tampão fosfato salino
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
RES	Grupo experimental Reserpina
RES.A	Grupo experimental Reserpina submetido a período de abstinência
SN	Substância negra
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância negra parte compacta
TDA	Transportador de Dopamina
TFS	Tampão fosfato de sódio
TH	Tirosina Hidroxilase
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VTa	Área tegmentar ventral
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Histórico da Doença de Parkinson	17
2.2 Epidemiologia e Etiologia	19
2.3 Fisiopatologia	21
2.4 Modelos Animais da DP	25
2.4.1 Modelo da Rotenona	27
2.4.2 Modelo da 6-OHDA	28
2.4.3 Modelo da MPTP	29
2.4.4 Modelo da Reserpina	30
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Drogas	36
4.3 Procedimentos Gerais	36
4.4 Peso Corporal	37
4.5 Delineamento Experimental	37
4.6 Perfusão	38
4.7 Testes Comportamentais	39
4.7.1 Teste de Catalepsia	39
4.7.2 Movimentos Orais	40
4.8 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase	41
4.9 Aquisição de Imagem	42
4.10 Contagem de Células	42
4.11 Avaliação da densitometria óptica relativa (DOR)	43
4.12 Análise Estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Variação do Peso	44
5.2 Resultados do comportamento de catalepsia	45
5.3 Resultados do teste de movimentos Orais	46
5.3.1 Movimentos Orais – Mastigação	46
5.3.2 Movimentos Orais – Protrusão	47

5.3.3	Movimentos Oro-Faciais – Tremor	48
5.4	Contagem de Células	49
5.4.1	Contagem de Células Substância Negra <i>Pars Compacta</i> (SNpc)	49
5.4.2	Contagem de Células Área Tegmentar Ventral (VTA)	49
5.5	Resultado da Densitometria Óptica Relativa (DOR)	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas são responsáveis por uma significativa redução da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e causam 12% do total das mortes no mundo (BENITO LEÓN, 2018; KOULI et al., 2018; D'SOUZA; RAJKUMAR, 2020). Dentre estas, a Doença de Parkinson (DP) é a segunda mais comum no mundo, sendo menos prevalente apenas que a doença de Alzheimer (LEÃO et al., 2015; HIRSCH et al., 2016; CHEN et al., 2001).

Diferentes fatores internos e externos podem estar associados ao desenvolvimento dessa doença degenerativa, tais como idade, fatores genéticos, toxinas ambientais, estresse oxidativo e neuroinflamação, os quais podem ocorrer isoladamente ou combinados e causar distúrbios neurológicos (BHATTACHARJEE et al., 2016; MARTIN-JIMÉNEZ et al., 2016; ELGUETA et al., 2017).

Os sintomas clínicos da DP são relacionados, principalmente, à perda progressiva e irreversível de neurônios dopaminérgicos situados na zona compacta da substância negra (SNpc) (CENTONZE et al., 1999; SUGAMA; KAKINUMA, 2016; YOUNG et al., 2016). Com a morte de tais neurônios, ocorre uma diminuição na liberação do neurotransmissor de dopamina em estruturas que recebem projeções provenientes desses neurônios (CENTONZE et al., 1999). A morte dessas células está associada com a presença de grande número de corpos de Lewy, os quais são formados por deposição proteica, principalmente, de alfa-sinucleína (VOON; FOX, 2007), e são responsáveis por processos de toxicidade e morte celular, principalmente dos neurônios dopaminérgicos (KOO; LEE; IM, 2008).

A DP é caracterizada principalmente por sintomas motores. Esses sintomas surgem de forma gradual e progressiva (VELÁZQUEZ-PANIAGUA et al., 2016). Dentre os sintomas motores mais conhecidos, o tremor de repouso é o primeiro a surgir, que posteriormente evolui para o déficit de marcha, rigidez muscular e instabilidade postural acompanhado por bradicinesia (lentidão de movimento) (PERUMAL; SANKAR, 2016). Além dos sintomas motores, tem sido relatada também a ocorrência de sintomas não-motores na DP, tanto em estágios iniciais quanto em fases mais avançadas da patologia, como, por exemplo, distúrbios de sono, problemas gastrointestinais, urinários e disfunções sexuais (COVA et al., 2016). Também podem ocorrer prejuízos cognitivos como, por

exemplo, déficit de aprendizagem (BEIGI et al., 2016). Estima-se que os sintomas não motores podem preceder as manifestações motoras clássicas em mais de uma década (LIDDLE, 2018).

Dentre os vários modelos animais encontrados na literatura e que mimetizam os sintomas do Parkinsonismo, o da reserpina (droga que inibe o transportador vesicular de monoaminas - VMAT, causando redução desses neurotransmissores central e periféricamente (HENRY et al., 1994)) causa sintomas de DP progressivamente, similar ao que ocorre em humanos (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957; DUTY; JENNER, 2011; LEÃO et al., 2017). Pesquisas com este modelo, além de caracterizar e estabelecer os sintomas motores cardinais da DP, evidenciam o surgimento de sintomas não-motores antes dos motores, possivelmente relacionados com o comprometimento de vias não dopaminérgicas, como as vias serotoninérgica e noradrenérgica (SANTOS et al., 2013; LEÃO et al., 2015; LEAL et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado alterações neuroquímicas, motoras, cognitivas e emocionais em animais tratados repetidamente com baixas doses de reserpina (SANTOS et al., 2013; LEÃO et al., 2015, 2017; LINS et al., 2018). Santos *et al.* (2013) mostrou em seu estudo que animais de 5 a 7 meses de idade, tratados com 10 injeções de reserpina são capazes de reverter os sintomas motores e parcialmente as alterações na imunorreatividade para TH, mas não as alterações cognitivas na tarefa de reconhecimento de objetos. Esse estudo demonstrou que o modelo é capaz de mimetizar a progressão da doença, mas não avaliou períodos de tratamento mais longos para verificar se o referido tratamento causaria maiores danos neuronais ou danos irreversíveis.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros comportamentais e imunohistoquímicos em situações de tratamento mais longo (45 injeções, uma a cada 48 horas, em um total de 90 dias). Ao aumentar a janela de exposição do animal à droga, avaliamos se as alterações continuariam progressivas, o que simularia melhor as fases da doença avançada em humanos. Em virtude do caráter progressivo dos achados no modelo, com o aumento do tempo de tratamento esperava-se que os sintomas motores se tornariam irreversíveis após a suspensão do tratamento. Tal situação permitiu uma melhor adequação do modelo animal à realidade da enfermidade em humanos, que apresenta como principais características o caráter progressivo e irreversível, favorecendo que novos estudos possam

ser realizados para o melhor entendimento da fisiopatologia, progressão, controle e tratamento da doença de Parkinson.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Doença de Parkinson

Relatos de sintomas compatíveis com a doença de Parkinson (DP) são encontrados em textos clássicos de Galeno (175a.C.) e na Ayurveda da medicina tradicional indiana (MANDAL, 2009). Referências a bradicinesia já eram encontrados na literatura antiga indiana desde dos anos 600 a.C. (OVALLATH; DEEPA, 2013). Uma descrição mais completa dos sintomas, do que hoje é conhecido como doença de Parkinson, foi feita por Charaka no ano 300 a.C., onde ele cita tremor, rigidez, bradicinesia e distúrbios da marcha. No século XV, o texto indiano clássico "Bhasava rajyam" denominava esse grupo de sintomas como Kampavata e indicava como tratamento o pó da semente de *Mucuna pruriens*, hoje conhecida por conter 4 a 6% de levodopa em seu extrato (MANYAM, 1990; OVALLATH; DEEPA, 2013). Entretanto, foi somente em 1817, na Inglaterra, que a doença foi redescoberta. James Parkinson, um cirurgião inglês, descreveu uma série de seis casos de pacientes seus e pacientes encaminhados, com sintomas de “*movimento involuntário trêmulo, com força muscular diminuída, (...); com uma propensão de curvatura do tronco para frente e aceleração do ritmo da caminhada: com sentidos e intelecto permanecendo ilesos*”, em um ensaio intitulado “*An Essay on The Shaking Palsy*” (PARKINSON, 2002; BERRIOS, 2016). Esse artigo não foi valorizado e não teve repercussão em sua época. Porém, anos depois, em 1876, o neurologista francês Jean Marie Charcot identificou casos semelhantes e nomeou a enfermidade como *maladie de Parkinson* – doença de Parkinson, em homenagem a seu colega inglês (BERRIOS, 2016). Charcot identificou duas formas da doença, a fase de tremor e a fase de rigidez.

Em 1880, William Gowers dedicou-se a estudar as características da doença em sua experiência com 80 pacientes. Os dados apresentados em seu “Manual das Doenças do Sistema Nervoso” incluíam a propensão da doença em homens e descrições das alterações posturais e deformidades articulares. Na década de 1920, Brissaud foi o primeiro a propor que o dano cerebral na doença de Parkinson estava relacionado à lesão na substância negra. Trétiakoff, Foix e Nicolesco também relacionaram patologias do mesencéfalo à DP. Em 1953, Greenfield e Bosanquet analisaram alterações cerebrais e lesões do tronco cerebral, distinguindo a doença de Parkinson de outras condições similares (GOETZ, 2011).

Ordenstein, um dos discípulos de Charcot, sugeriu o uso de alcaloides de beladona no tratamento da doença no início do século XIX. Estes agentes são drogas anticolinérgicas que agem centralmente e são usadas em algumas formas de parkinsonismo. Charcot indicava o uso de hioscinamina, um agente anticolinérgico, como uma das terapias para a doença de Parkinson. Algumas medicações de uso clínico foram importantes no estudo da DP. O surgimento de agentes anti-psicóticos na década de 1940 trouxe grande benefício clínico para pacientes com esquizofrenia e outros comportamentos psicóticos, porém induziu parkinsonismo muito semelhante à DP. O estudo dessas substâncias e seus mecanismos de ação ajudaram a esclarecer a relação da DP com o metabolismo da dopamina, visto que as drogas anti-psicóticas levam a um bloqueio dos receptores de dopamina no estriado, explicando os sintomas clínicos de parkinsonismo (HORNYKIEWICZ, 2002; GOETZ, 2011).

A dopamina foi sintetizada inicialmente por Barger e Ewens em 1910. Holtz descobriu a enzima dopa-descarboxilase e documentou que a levodopa era quebrada em dopamina através de sua ação. Birkmayer, em 1961, injetou levodopa intravenosa em pacientes com Parkinson pela primeira vez e relatou em seu trabalho uma significativa melhora clínica de pacientes com sintomas severos. A levodopa, com ou sem associações, tem sido usada até hoje para o tratamento da DP (GOETZ, 2011).

O estadiamento e a progressão clínica da doença de Parkinson foram descritos por Hoehn e Yahr em 1967, que posteriormente introduziram um sistema de classificação reconhecido internacionalmente (GOETZ et al., 2004).

A escala de Hoehn e Yahr é um sistema de classificação comumente usado para descrever a progressão dos sintomas da doença de Parkinson (HOEHN; YAHR, 1967). A escala, demonstrada na Tabela 1, foi posteriormente modificada para incluir características intermediárias nos itens 1.5 e 2.5. (HOEHN; YAHR, 1967; GOETZ et al., 2004)

Atualmente também tem sido muito utilizada a Escala de Classificação de Doenças de Parkinson Unificada (UPDRS) modificada pela Sociedade de Desordens do Movimento (MDS) que inclui, além dos parâmetros descritos por Hoehn e Yahr, a avaliação de elementos não motores (GOETZ et al., 2007).

Tabela 1 - Estágios clínicos da DP pela escala de Hoehn e Yahr e Hoehn e Yahr modificada. Modificado de Goetz et al 2004

Etapa	Escala Hoehn e Yahr	Escala Hoehn e Yahr modificada
1	Envolvimento unilateral apenas, incapacidade funcional mínima ou inexistente	Apenas envolvimento unilateral
1.5	-	Envolvimento unilateral e axial
2	Envolvimento bilateral ou da linha média sem comprometimento do equilíbrio	Envolvimento bilateral sem prejuízo do equilíbrio
2.5	-	Doença bilateral leve com recuperação no teste de tração
3	Doença bilateral: incapacidade leve a moderada com reflexos posturais comprometidos; fisicamente independente	Doença bilateral leve a moderada; alguma instabilidade postural; fisicamente independente
4	Doença gravemente incapacitante; ainda é capaz de andar ou ficar em pé sem ajuda	Deficiência grave; ainda é capaz de andar ou ficar em pé sem ajuda
5	Confinamento na cama ou cadeira de rodas, a menos que seja auxiliado	Confinado a cadeira de rodas ou acamado, a menos que auxiliado

2.2 Epidemiologia e Etiologia

A prevalência e incidência de DP variam amplamente em todo o mundo. Em geral, na Europa e nos Estados Unidos, a prevalência é mais alta do que nos demais países e é relativamente uniforme, sem grandes variações. (CHEN et al., 2001; TYSNES; STORSTEIN, 2017; BENITO LEÓN, 2018). A prevalência da doença é geralmente aceita entre 100 e 200 por 100.000 pessoas e a incidência anual é estimada em cerca de 15 por 100.000 (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

A causa da DP não é conhecida, mas vários fatores de risco genéticos já foram caracterizados, bem como vários genes que causam formas familiares raras de DP. As formas monogênicas da DP são provavelmente raras populações não selecionadas, mas pode ser frequente em algumas etnias. Em geral, acredita-se que fatores genéticos sejam envolvido em apenas 5 a 10% dos casos (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Postularam-se influências ambientais como tabagismo, consumo de cafeína e exposição a pesticidas para alterar o risco de desenvolvimento de DP, embora o papel delas permaneça incerto (KOULI et al., 2018). A etiologia da doença de Parkinson é multifatorial, envolvendo

fatores ambientais e genéticos. A idade parece ser o fator de risco mais importante, com aumento da incidência em idades mais avançadas. A média de idade no início da doença é de 60 anos (LEES; HARDY; REVESZ, 2009), com importante aumento na incidência em idades mais avançadas. A prevalência é variável nos diversos estudos e situa-se em cerca de 1 a 2% nos idosos acima de 60 anos e aumenta para cerca de 4% acima de 80 anos (MARINO et al., 2020). Com o envelhecimento da população, estima-se um aumento de 30% nos casos de DP até 2030. Além disso, existe uma importante variação na incidência em grupos étnico-culturais diferentes. Nos países asiáticos, na América Latina e na África, é menor, especialmente no último continente. Essas diferenças podem dever-se, em parte, a fatores específicos da população estudada (ou seja, maior mortalidade devido a menos recursos econômicos). (CHEN et al., 2001; KALIA; LANG, 2015; BENITO LEÓN, 2018).

Diversos fatores ambientais têm sido estudados por sua relação com a DP. Dentre eles destaca-se o uso do tabaco. Uma grande metanálise conduzida por Hernán e colaboradores em 2002, que incluiu dados de 20 países, mostrou uma relação inversa entre o consumo de tabaco e a prevalência de DP, com um risco-relativo de 0,39 para fumantes. Estudos posteriores (RITZ et al., 2007; BRECKENRIDGE et al., 2016; KOULI et al., 2018) confirmaram este “efeito protetor” e acrescentaram que também existe uma relação inversa entre a DP e o número de maços fumados por ano e número de anos fumando, com risco significativamente reduzido em fumantes pesados ou de longa-data em comparação a não fumantes. Ainda é alvo de estudos o motivo deste efeito protetor. Porém acredita-se que esteja relacionado à ativação de receptores nicotínicos da acetilcolina em neurônios dopaminérgicos, que apresenta efeito neuroprotetor, além disso a nicotina pode estimular a liberação de dopamina envolvida no mecanismo de recompensa. Um dos mecanismos propostos para esta relação seria que a nicotina não apresenta efeito protetor e sim a DP faz com que o paciente tenha menor propensão ao uso regular de cigarros, ao passo que a redução de dopamina causada pela DP estimularia menos o sistema de recompensa após o uso da nicotina. Esta hipótese é apoiada pela observação de que pacientes com DP e DP inicial conseguem largar o cigarro mais facilmente que controles sem DP (RITZ et al., 2014).

Assim como com o cigarro, também se verifica uma relação inversa entre o consumo de cafeína e a DP. A cafeína é uma antagonista do receptor de adenosina A_{2A} que parece exercer efeito neuroprotetor para DP. Hernán e colaboradores em (2002) mostraram

um risco relativo de 0,69 para desenvolvimento de DP em pessoas que mantêm o hábito de beber café. Este efeito protetor, entretanto, é mais acentuado em homens e em mulheres pós-menopausa que não estão fazendo reposição hormonal, sugerindo forte relação com o metabolismo do estrogênio.

Outros fatores ambientais também estão relacionados com a DP. Toxinas ambientais e pesticidas têm sido frequentemente estudados como causadores de DP. O pesticida rotenona e o herbicida paraquat (similar ao MPP+) são inibidores seletivos do complexo I mitocondrial, lesando prioritariamente células dopaminérgicas na substância negra. A associação entre o uso de pesticidas e maior prevalência de DP tem sido verificada por vários estudos epidemiológicos, inclusive utilizando marcadores indiretos como viver na zona rural e origem da água consumida (ELBAZ et al., 2009; BRECKENRIDGE et al., 2016). Souza et al (2020) mostraram que a exposição ao piretróide deltametrina é capaz de causar alterações comportamentais e fisiopatológicas na via dopaminérgica, semelhante às observadas na DP.

2.3 Fisiopatologia

As características patológicas clássica da doença de Parkinson são a degeneração de neurônios dopaminérgicos na *pars compacta* da substância negra (SNpc) no mesencéfalo e a presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos chamados de corpos de Lewy (BEAL, 2001), embora os mecanismos de sua patogênese ainda não estejam completamente elucidados (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018). Estas características patológicas parecem ser causadas por uma cadeia de eventos, com lesões em diferentes momentos que se somam, produzindo dano acumulado e surgimento dos sintomas posteriormente. De acordo com Sulzer (2007), este dano acumulado é explicado através da hipótese de acúmulo de danos, relacionados a fenômenos de oxidação e inflamação. Esta hipótese advoga que múltiplos fatores de risco, incluindo predisposição genética, exposição a toxinas, envelhecimento e potenciais fatores outros ainda desconhecidos, interagem para produzir a DP (CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006).

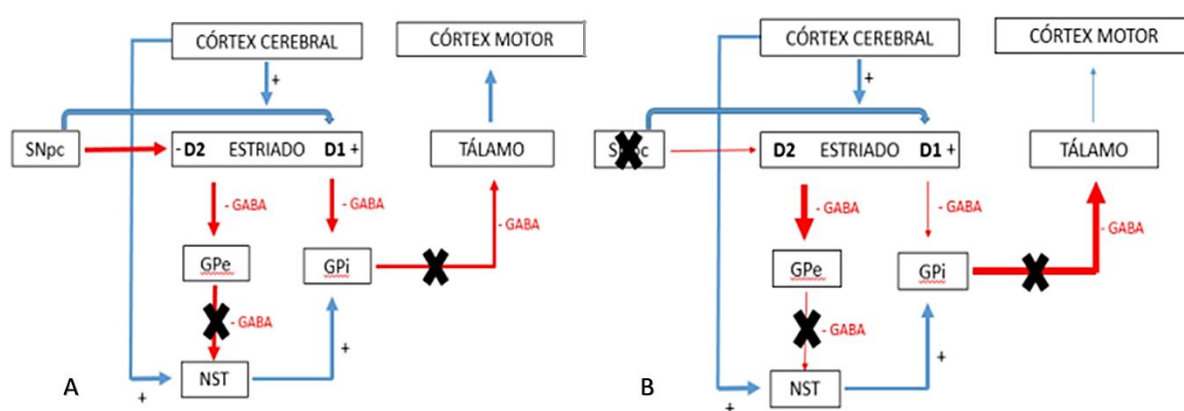
Estudos morfométricos *post-mortem* mostraram que em pacientes com início dos sintomas motores já existia uma perda neuronal na SNpc de cerca de 30% (MA et al., 1997), e nos pacientes com sintomas motores bem estabelecidos esta perda neuronal

atingia cerca de 60%, com forte correlação entre a intensidade dos sintomas e a perda neuronal (MA et al., 1997). A estimativa da perda neuronal no início dos sintomas motores varia de acordo com os autores, oscilando entre 60 a 80% (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018). A perda neuronal na SNpc leva à denervação da via nigrostriatal, causando diminuição dos níveis de dopamina no estriado. Estudos têm mostrado que a perda neuronal na SNpc é precedida pela degeneração dos terminais axonais que se projetam para os núcleos da base, notadamente o estriado, o que ratifica a importância da fase pré-clínica na fisiopatologia da doença (KORDOWER et al., 2013).

Alterações nas vias dopaminérgicas que regulam o movimento estão relacionadas aos sintomas motores. Os núcleos da base, embora não sejam responsáveis pela execução direta dos movimentos, atuam no controle e ajuste da atividade motora através de um circuito que envolve impulsos do córtex cerebral, influxos dopaminérgicos da substância negra e resposta para o córtex através do tálamo (STANDAERT; WALSH, 2014). O estriado é o principal responsável pelo processamento do controle do movimento. Impulsos corticais excitatórios são direcionados para o estriado e usam o glutamato como transmissor. Do estriado saem duas projeções que utilizam o neurotransmissor inibitório o ácido gama-aminobutírico (GABA) e formam as vias direta e indireta, conforme demonstrado na figura 1. O controle entre a via direta e indireta regula o movimento (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989). A via direta é formada por neurônios estriatais com receptores dopaminérgicos D1 projetados para a via de saída dos núcleos da base, o globo pálido parte interna (GPi) de onde partem projeções inibitórias GABAérgicas para o tálamo. A via talamocortical que é inibitória, ao ser inibida pela projeção do GPi, passa a estimular o córtex, promovendo o movimento. Dessa forma, a ativação da via direta suprime a inibição do tálamo ao córtex, isto é, a ativação da via direta estimula o movimento. A via indireta por sua vez inicia-se nas projeções dopaminérgicas D2 do estriado para a parte externa do globo pálido (GPe), de onde partem projeções também inibitórias para o núcleo subtalâmico. Do núcleo subtalâmico, por sua vez, partem projeções glutamatérgicas excitatórias para o GPi, que permitem a ação inibitória do GPi sobre o tálamo, inibindo o movimento. Dessa forma, a ativação da via indireta suprime a inibição do GPe sobre o núcleo subtalâmico, permitindo a inibição do GPi sobre o tálamo, inibindo o movimento, conforme esquematizado na Figura 1. O influxo dopaminérgico ocorre no estriado vindo da substância negra pela via nigrostriatal. A presença de dopamina no estriado em indivíduos normais permite a ativação dos receptores D1 da via

direta e a inibição de receptores D2 da via indireta promovendo o movimento. De forma contrária, na DP, existe redução do aporte de dopamina no estriado, o que causa alterações no movimento relacionadas a redução da atividade da via direta e desinibição da via indireta. (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989; GOLAN et al., 2014).

Figura 1 – Representação esquemática dos circuitos dos núcleos da base relacionados ao movimento. (A) Transmissão normal; (B) Desequilíbrio na transmissão em pacientes com DP. Fonte: Santos et al, 2012 (adaptado) SNpc – Substância negra pars compacta, GPe – Globo pálido parte externa, GPi – globo pálido parte interna, NST – Núcleo subtalâmico



Assim como a degeneração da SNpc é o principal marcador macroscópico da DP, a presença de corpos de Lewy é o principal marcador microscópico da doença. A morte dessas células da SNpc está associada com a presença de grande número de corpos de Lewy, os quais são formados por deposição proteica, principalmente de alfa-sinucleína (VOON; FOX, 2007). Os corpos de inclusão neuronais originalmente descritos por Friedrich Lewy em 1912 contêm agregados patológicos de pequenas proteínas (alfa-sinucleína) que normalmente são solúveis (BORGHAMMER, 2018). Corpos de Lewy são pequenas (5–25 μm) inclusões esféricas que consistem em um centro granular circundado por filamentos radiais, que podem ser marcados com anticorpos para alfa-sinucleína e ubiquitina. Também se observa perda neuronal, menos severa, em outros núcleos do tronco cerebral relacionados a catecolamina e serotonina, assim como em neurônios do hipotálamo e do núcleo basal de Meiner (BEAL, 2001).

Ratos com mutações que suprimem o gene da α -sinucleína são viáveis e com cérebros normais e não mostram nenhum déficit nos corpos celulares dopaminérgicos, suas

fibras ou terminais. Isto mostra que não é a perda da função da α -sinucleína a causadora da doença de Parkinson e sugere que as mutações da α -sinucleína podem causar DP por ganho de alguma função (BEAL, 2001).

A distribuição dos corpos de Lewy nos cérebros dos pacientes com DP não é randômica, mas obedece a uma sequência, que foi esquematizada por Braak (2003), onde os corpos de inclusão aparecem inicialmente no bulbo olfatório e no núcleo dorsal motor do vago e ascendem em um padrão previsível com envolvimento subsequente dos núcleos pontinos monoaminérgicos e neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) (BORGHAMMER, 2018).

A alfa-sinucleína tem sido observada também fora do cérebro, especificamente na medula espinhal e em gânglios simpáticos, além de órgãos periféricos como retina, útero, bexiga, pele, coração e aorta, além de sistema gastrointestinal, incluindo glândulas submandibulares, estômago e intestinos, muitos anos antes do diagnóstico de DP (BORGHAMMER, 2018; STOKER; GREENLAND, 2018). De acordo com Braak (2003), o sistema nervoso entérico é afetado pelas alterações da alfa-sinucleína antes da SN. O trato gastrointestinal tem extensas redes neuronal e imune e está em contato direto com o meio externo, promovendo uma conexão entre o desenvolvimento da DP e os fatores ambientais. Alguns estudos propõem que a DP se inicia no intestino e se dissemina através do nervo vago para o SNC e alcança a SNpc (STOKER; GREENLAND, 2018). Um estudo epidemiológico realizado na Dinamarca mostrou que pacientes submetidos a vagotomia total apresentavam um risco reduzido de DP subsequente (SVENSSON et al., 2015). Um estudo em modelo animal com rotenona em camundongos demonstrou que, quando o estômago dos camundongos é exposto a rotenona, observam-se agregados de alfa-sinucleína e subsequente disseminação para o tronco cerebral via nervo vago. Entretanto a simpatectomia e vagotomia foram capazes de retardar significativamente o surgimento dos sintomas motores nos animais, assim como o acúmulo de alfa-sinucleína no núcleo dorsal motor do vago preveniu a morte celular na SNpc (BORGHAMMER, 2018).

As alterações da alfa-sinucleína são reconhecidamente importantes na patogênese da DP e alguns autores advogam que a doença pode se originar em bulbos olfatórios e em terminais nervosos gastrointestinais e se disseminar para o SNC. Essa disseminação pode ser explicada pelo comportamento da alfa-sinucleína semelhante aos príons, já demonstrada tanto *in vitro* quanto em modelos animais de DP (BORGHAMMER, 2018).

O desdobramento incorreto da alfa-sinucleína confere propriedades semelhantes a príons, permitindo sua propagação de célula para célula (LIDDLE, 2018), ao induzir o desdobramento da alfa-sinucleína endógena nas células receptoras, levando à formação de oligômeros que progridem para fibrilas e eventualmente corpos de Lewy.

Evidências sugerem que condições ambientais como ingestão de toxinas e alterações na microbiota, assim como infecções bacterianas ou virais ou inflamações do trato gastrointestinal, como apendicite, por exemplo, podem induzir a formação de agregados de alfa-sinucleína nas células intestinais (BORGHAMMER, 2018; LIDDLE, 2018). Ainda segundo os mesmos autores, as células enteroendócrinas (células sensoriais do intestino) apresentam agregados de alfa-sinucleína e fazem sinapse com nervos entéricos, permitindo uma conexão do intestino com o cérebro. Este tipo de disseminação é similar em alguns aspectos ao encontrado em doenças priônicas bem estudadas, como na Doença de Creutzfeldt-Jakob. Entretanto, existem controvérsias quanto a esta hipótese de disseminação do intestino para o cérebro. Surmeier, Obeso e Halliday (2017) resumizam os principais pontos que consideram relevantes para contrapor esta hipótese: (1) os dados *post mortem* não confirmam a evolução da disseminação no cérebro em função do tempo e do *status* da doença; (2) somente metade dos pacientes com DP sintomática tem cérebros com presença de corpos de Lewy com padrão consistente com o estadiamento de Braak; (3) alguns pacientes com DP sintomática não têm corpos de Lewy; (4) mesmo nos cérebros de DP em estágio avançado, os corpos de Lewy têm uma distribuição discreta, fragmentada; (5) dentro de cada núcleo ou região que apresenta corpos de Lewy, a distribuição é esparsa e confinada a tipos celulares específicos, acometendo neurônios colinérgicos e catecolaminérgicos, com neurônios GABAérgicos nunca acometidos (SURMEIER; OBESO; HALLIDAY, 2017).

2.4 Modelos Animais da DP

Desde o século XIX, os animais já eram considerados meios para estudar a DP. Nos textos clássicos de Charcot em 1865, ele comenta sobre um grupo germânico liderado por Henie e Volkman, que estariam usando uma toxina com propriedades tremorígenicas em sapos (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018), que provavelmente é o primeiro relato do uso de animais para estudar DP. No início do século XX, também foi utilizada ablação cirúrgica para induzir rigidez cataléptica em gatos. Na década de 1950, Kline (KLINE,

1954) chamou atenção com o uso de um alcaloide, reserpina, para induzir sintomas de DP. A droga, inicialmente usada para tratar doenças mentais, induzia, quando injetada em ratos, redução da mobilidade, alterações da postura, tremores e rigidez. Em 1957, Carlsson determinou que os sintomas de parkinsonismo da reserpina podiam ser revertidos por injeções de levodopa e que os níveis de DA no cérebro eram reduzidos pela reserpina e restabelecidos pela levodopa (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957b; CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006). Os modelos animais utilizados atualmente para doença de Parkinson incluem: modelo da reserpina, modelo da rotenona, modelo da 6-Hidroxidopamina, modelo da MPTP e modelos genéticos (superexpressão do gene α -sinucleína em drosófilas e em ratos) (BEAL, 2001).

Um modelo animal para a DP, idealmente, deve obedecer aos seguintes critérios: perda gradual dos neurônios dopaminérgicos em adultos; déficits motores facilmente detectáveis / caracterizáveis; desenvolvimento de corpos de Lewy; tempo curto para desenvolvimento do modelo (poucos meses) e, por último, caso seja um modelo genético, que seja baseado em uma única mutação (BEAL, 2001). Adicionalmente, deve refletir a deterioração motora e sintomas não motores, oferecendo aos pesquisadores a oportunidade de testar novas terapias em um período em que a degeneração neuronal possa ser ainda reversível (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; VINGILL; CONNOR-ROBSON; WADE-MARTINS, 2018)

Infelizmente, até o momento, não há nenhum modelo animal que reproduza todas as características fenotípicas e patológicas da DP (BEAL, 2001; CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006; GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018).

Considerando que a etiologia da DP é multifatorial e ainda não completamente esclarecida, com fatores genéticos predominando em alguns casos e fatores ambientais em outros, modelos animais diferentes para DP foram criados abrangendo desde modificação genética até utilização de toxinas em diferentes animais (drosófilas, roedores, primatas não humanos). Cada modelo tem seus pontos fortes e fracos e selecionar o modelo ideal depende dos objetivos específicos para os quais o trabalho é planejado (VINGILL; CONNOR-ROBSON; WADE-MARTINS, 2018). Além disso, dado que cada trabalho recapitula uma parte das características fisiopatológicas da DP, o uso de múltiplos modelos pode ser útil para fornecer uma visão mais ampla da patogênese da DP (GRANDI; DI

GIOVANNI; GALATI, 2018). A Tabela 2 sumariza alguns destes pontos principais de modelos animais para DP.

Tabela 2- Comparação das características humanas na DP com os modelos Animais. Modificado de Carvey et al, 2006.

Características	Modelos Animais					
	6-OHDA	MPTP	Herbicidas (rotenona)	LPS Pré-Natal	Modelos Genéticos	Reserpina
Progressão	não	não	não	alguma	sim	sim
Inclusões de Corpos de Lewy	não	não	sim	sim	sim	Não avaliado
Alterações na DA no estriado	sim	sim	sim	sim	limitado	sim
Neuroinflamação	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Radicais Livres	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Alterações comportamentais	limitado	sim	sim	limitado	limitado	sim
Perda em outras áreas do cérebro	LC	Não avaliado	Não avaliado	LC, serotonina	Não avaliado	LC, serotonina
Características periféricas	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado

2.4.1 Modelo da Rotenona

A rotenona é um composto encontrado na raiz de algumas plantas que tem sido usado como inseticida. A rotenona tem uma alta afinidade pelo inibidor do complexo I da membrana mitocondrial envolvido na fosforilação oxidativa. Déficits no complexo I mitocondrial já foram verificados na substância negra de pessoas com DP. O modelo da rotenona, proposto por Betarbet et al (2000), utiliza infusão em pequenos reservatórios subcutâneos canulados para veia jugular em ratos que apresentam uma degeneração progressiva dos neurônios nigrostriatais com redução da imunoreatividade para tirosina hidroxilase, transportador de dopamina e transportador de monoamina vesicular. Também foram identificadas inclusões citoplasmáticas semelhantes aos corpos de Lewy nos neurônios da substância negra, assim como apresentaram sintomas motores como bradicinesia e instabilidade. A rotenona inibe parcialmente o complexo I mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons, com uma seletividade para neurônios nigrostriatais que são particularmente vulneráveis. Este efeito deve ser mediado por estresse oxidativo, dado que a dose utilizada não é alta o suficiente para causar bloqueio da cadeia respiratória.

Uma importante limitação deste modelo é que existe uma grande variabilidade na suscetibilidade da droga entre os ratos, fazendo com que somente alguns dos animais submetidos à mesma dose apresentem os sintomas. Esta variabilidade limita o uso do modelo para testes terapêuticos, entretanto ainda pode ser útil no estudo da fisiopatologia da DP (BETARBET et al., 2000; BEAL, 2001).

2.4.2 Modelo da 6-OHDA

A 6-OHDA é um análogo da DA que foi hidroxilado. Foi inicialmente descrita no início dos anos 1960 com função de depletar noradrenalina em corações de camundongos e como neurotoxina para induzir degeneração em terminais adrenérgicos simpáticos (CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006). Posteriormente foi utilizada para lesar o sistema dopaminérgico nigroestriatal e criar depleção de DA parcial ou total como modelo animal de DP. A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, devendo ser injetada diretamente no SNC ou intracerebro-ventricular (icv). A 6-OHDA possui alta afinidade pelos transportadores de catecolaminas, que a conduzem para o interior dos neurônios, onde induz reações de oxidação, levando os neurônios à morte por estresse oxidativo. Após a administração da 6-OHDA, observam-se alterações motoras e não motoras, tais como déficit cognitivo, depressão, ansiedade e distúrbios do sono (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018). Alterações motoras são verificadas com doses mais altas de 6-OHDA, entretanto doses mais baixas podem diminuir a densidade de neurônios reativos a TH na SN e VTA. A 6-OHDA é um modelo mais agressivo em termos de morte celular, perda de peso e taxa de mortalidade. Em um estudo em ratos, Troug et al. (2006) testou os efeitos de diferentes doses de 6-OHDA, determinando o percentual de perda celular e alterações comportamentais. Verificou que com 40% de perda neuronal na SNpc ratos apresentavam alterações motoras, enquanto em humanos estima-se perda neuronal de cerca de 70% para surgimento de alterações motoras clássicas. Esse fator pode indicar uma lesão muito aguda na SN, com súbito declínio da DA, impedindo os mecanismos compensatórios de agirem, tornando uma importante limitação para estudo das alterações mais iniciais da DP. Modelos de lesão parcial têm sido usados para entender os mecanismos iniciais da neurodegeneração irreversível e para testar novos compostos terapêuticos (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018)

A 6-OHDA quando injetada por via icv não destrói somente neurônios dopaminérgicos, agindo também em outros tipos celulares catecolaminérgicos, o que pode ser tanto uma limitação do método como uma boa ferramenta para avaliar as lesões e mecanismos fisiopatológicos determinados por alteração em outras monoaminas, tais como a depleção de noradrenalina no LC (*locus cerúleo*) (CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006).

2.4.3 Modelo da MPTP

Um dos primeiros modelos animais para estudo da doença de Parkinson surgiu de uma observação sagaz publicada por Langston em 1983. Um grupo de jovens usuários de heroína sintética desenvolveu sintomas severos semelhantes a doença de Parkinson, porém em idade muito mais jovem e com sintomas mais severos que o usual. Investigações subsequentes indicaram a presença de uma toxina, MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), na droga sintética que os jovens utilizavam. O MPTP é capaz de lesar seletivamente a substância negra do mesencéfalo, levando ao quadro de parkinsonismo. O uso de MPTP em animais experimentais foi então utilizado como modelo animal para estudo do Parkinson (GOETZ, 2011).

A MPTP é uma toxina altamente lipossolúvel e capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. No SNC, ela é convertida em seu metabólito MPP (1-metil-4-fenilpiridínio), pela monoamina oxidase B (MAO-B), uma enzima envolvida na degradação das catecolaminas. O MPP é liberado pelos astrócitos nigrais e estriatais e captado pelos neurônios dopaminérgicos, entrando na célula pelo transportador de dopamina na membrana (DAT) e então captado pelo transportador de monoaminas vesicular (VMAT), sendo concentrado na mitocôndria, onde inibe a ação do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, diminuindo a geração de ATP e aumentando a produção de radicais livres. O efeito neurotóxico é dado pelo aumento do estresse oxidativo (BEAL, 2001; GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; VINGILL; CONNOR-ROBSON; WADE-MARTINS, 2018). O uso do MPTP em primatas é capaz de replicar todos os sintomas cardinais da DP, incluindo tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. O modelo MPTP também tem sido relatado como útil para induzir os sintomas iniciais não motores da DP, notadamente com protocolo crônico em primatas não-humanos (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018). Estes animais apresentam excelente resposta com o tratamento com levodopa. A toxina leva à perda de neurônios na SNpc e no *locus ceruleus*.

Os protocolos que usam doses mais baixas cronicamente, em oposição ao uso agudo em doses altas, apresentam uma maior perda de terminais dopaminérgicos no putamen e apresentam inclusões citoplasmáticas semelhantes aos corpos de Lewy. Entretanto o uso crônico em primatas necessita de um tempo mais longo de experimentação (BEAL, 2001).

Experimentos em primatas não humanos consomem muito tempo e dinheiro e apresentam diversas questões éticas envolvidas. Experimentos em camundongos, portanto, obtiveram um grande espaço. Existem descritos vários protocolos desde uso agudo (quatro injeções intraperitoneais em um único dia) e crônico com esquemas de dose que variam de cinco a 28 dias de injeções. As vias de administração são igualmente variadas, desde intraperitoneal para uso agudo e subagudo, injeções subcutâneas em protocolos crônicos e injeções estereotáxicas intranigrais em protocolos agudos e subagudos (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018).

Em camundongos, o uso do MPTP diariamente por cinco dias mostrou indução de morte celular por apoptose, com aumento da imunorreatividade para caspase-3 e BAX nos neurônios da substância negra. A atividade inflamatória também parece ter um papel no dano celular, sendo demonstrados ativação da micróglia e linfócitos em ratos submetidos a MPTP e neuroproteção em ratos submetidos a MPTP que tiveram a COX1 e COX2 (ciclo-oxigenase 1 e 2) bloqueadas (BEAL, 2011). Camundongos submetidos a injeções intraperitoneais em protocolo agudo apresentaram morte celular por necrose e alta mortalidade. Alguns estudos têm utilizado em roedores a via intranasal com administração única, apresentando interessantes resultados de redução da expressão de TH e perda neuronal na SN, sem entretanto demonstrar alterações motoras, podendo ser considerado um modelo inicial de DP (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018).

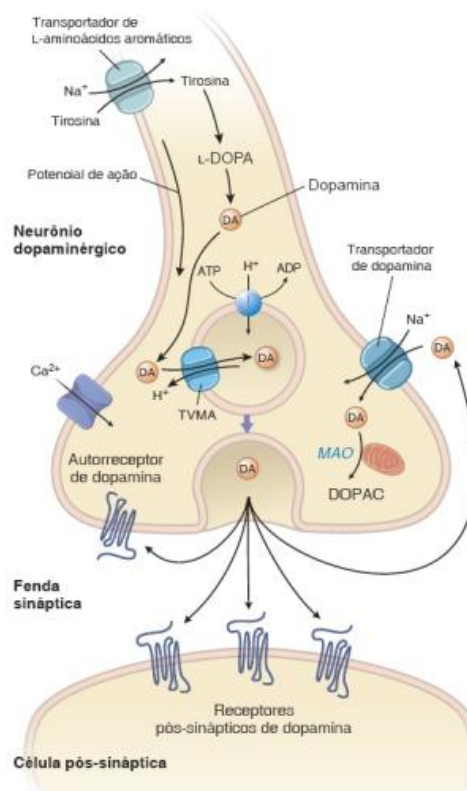
O MPTP é reconhecidamente tóxico para humanos, primatas, gatos e coelhos, mas nem todos os roedores são suscetíveis. Ratos são sensíveis apenas ao MPP quando infundido diretamente no SNC ou estriado.

2.4.4 Modelo da Reserpina

A administração de reserpina em animais é capaz de induzir parkinsonismo (hipomobibilidade, catalepsia, rigidez muscular e tremores), sendo, portanto, útil como modelo animal de DP. A reserpina é um alcaloide extraído de uma planta (*Rauwolfia*

serpentina), capaz de depletar os estoques de monoaminas nos terminais nervosos. Na década de 1950, Kline (KLINE, 1954) chamou atenção com o uso desse alcaloide, reserpina, para induzir sintomas de DP. A droga, inicialmente usada para tratar doenças mentais, induzia, quando injetada em ratos, redução da mobilidade, alterações da postura, tremores e rigidez. Em 1957, Carlsson determinou que os sintomas de parkinsonismo da reserpina podiam ser revertidos por injeções de levodopa e que os níveis de DA no cérebro eram reduzidos pela reserpina e restabelecidos pela levodopa (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957; CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006). A reserpina foi durante muito tempo usada também como anti-hipertensivo devido à sua capacidade de depletar monoaminas com efeito hipertensor, dado que a ação da reserpina nos terminais sinápticos não está restrita à dopamina. A reserpina age no interior dos terminais sinápticos, bloqueando VMAT (transportador vesicular de monoaminas do tipo 1 e 2). A VMAT faz parte da cadeia de eventos na síntese das catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina). Uma melhor compreensão do mecanismo de ação da reserpina depende do conhecimento das vias de síntese, transporte e degradação da dopamina (Figura 2).

Figura 2 - Metabolismo da dopamina. Fonte: Golan *et al*, 2014. ATP – Adenosina trifosfato, ADP – Adenosina difosfato, LDOPA – levodopa, TVMA – transportador vesicular de monoaminas, DA – dopamina, MAO – monoamina oxidase, DOPAC - Ácido 3,4-diidroxifenilacético

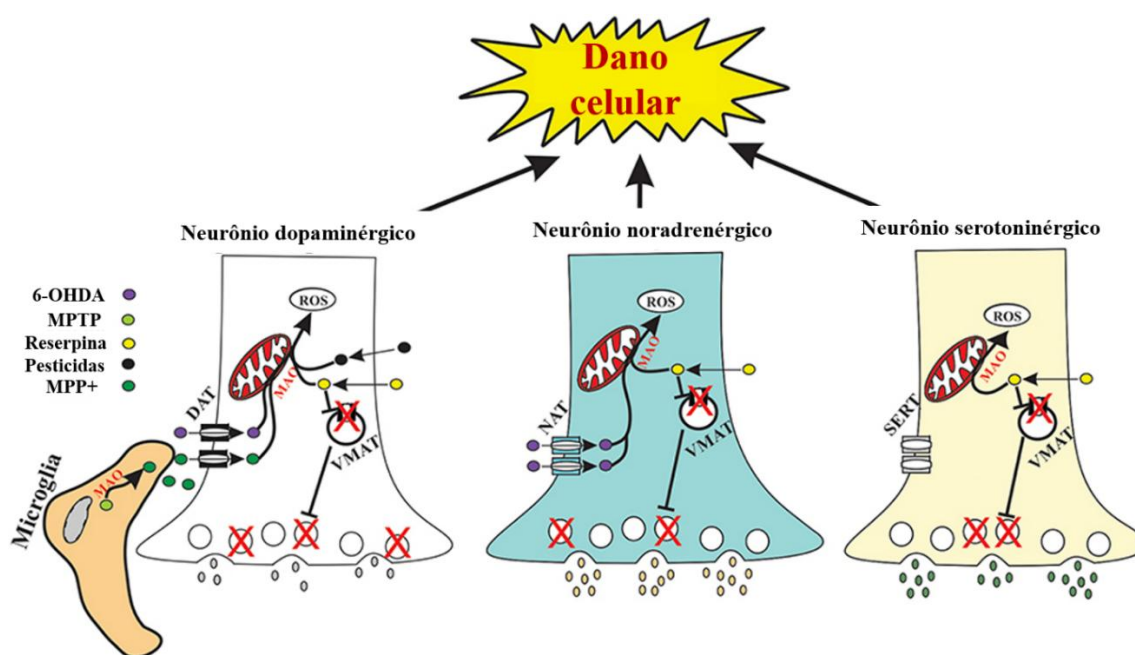


O aminoácido tirosina é o precursor de todas as catecolaminas. A oxidação da posição 3 no anel de benzeno da tirosina é a primeira etapa na síntese da DA, convertendo a tirosina em L-DOPA (L-3,4-di-hidroxifenilalanina ou levodopa). Essa reação é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH). A oxidação da tirosina a L-DOPA constitui a etapa que limita a velocidade na produção não apenas da DA, mas também de todos os neurotransmissores de catecolaminas. A etapa seguinte é a conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (DOPA descarboxilase). A DOPA descarboxilase é expressa por neurônios dopaminérgicos, mas também está presente em células não dopaminérgicas e na glia. A DA sintetizada no citoplasma do neurônio é transportada para o interior de vesículas secretoras através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT), que usa um gradiente eletroquímico para efetuar o transporte de DA para dentro da vesícula contra seu gradiente de concentração. Com a estimulação da célula nervosa, as vesículas de armazenamento de DA fundem-se com a membrana plasmática de modo dependente de cálcio, liberando DA na fenda sináptica. Na fenda, a DA pode ligar-se tanto a receptores de DA pós-sinápticos quanto a autorreceptores de DA pré-sinápticos. A maior parte da DA liberada na fenda sináptica é transportada de volta à célula pré-sináptica pelo transportador de dopamina (TDA). A DA captada no interior da célula pré-sináptica pode ser reciclada em vesículas para uso subsequente na neurotransmissão (pelo VMAT), ou pode ser degradada pela ação das enzimas monoamina oxidase (MAO) ou catecol-O-metiltransferase (COMT) (STANDAERT; WALSH, 2014).

Com o bloqueio do VMAT pela reserpina, a maior parte da DA que retornou para o interior da célula pré-sináptica é metabolizada pela MAO. A monoamina oxidase B (MAO-B) degrada a dopamina, promovendo o acúmulo de glutamato e o estresse oxidativo com a liberação de radicais livres, causando excitotoxicidade e possivelmente morte celular (LEÃO et al., 2015b; MARINO et al., 2020). Devido ao mecanismo de ação da reserpina, pode-se depreender que sua ação não está limitada à depleção da dopamina, determinando também a depleção de outros neurotransmissores catecolinérgicos como serotonina e noradrenalina. Esta característica, que inicialmente poderia representar uma limitação na especificidade do modelo, tem se mostrado uma vantagem notadamente no estudo das etapas iniciais da DP com sintomas não-motores, conforme avança o conhecimento do envolvimento de vias não dopaminérgicas na fisiopatologia da DP (FERNANDES et al., 2008, 2012; LEÃO et al., 2015; SANTOS et al., 2013).

Na Figura 3 apresentamos um esquema que permite comparar os locais e a ação de diferentes drogas e toxinas no terminal sináptico, todos determinando a seu modo um dano celular que justifica o seu uso como modelo de DP. Destaca-se a ação da reserpina nos neurônios dopaminérgicos, porém também em neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos, permitindo simular características não motoras, em geral, iniciais da DP (FERNANDES et al., 2008; SANTOS et al., 2013; LEÃO et al., 2015; LEAL et al., 2016, 2019).

Figura 3 - Mecanismos de dano celular em alguns modelos animais para DP. Fonte: Leal et al, 2016 (adaptada). 6-OHDA – 6-hidroxidopamina, MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridínio, DAT – transportador de dopamina, VMAT – transportador vesicular de monoaminas, MAO – monoamino oxidase, ROS – espécies reativas de oxigênio, NAT – transportador de noradrenalina, SERT – transportador de serotonina



Desde que a reserpina começou a ser utilizada como modelo animal de DP, surgiram muitas variações de metodologia e mudanças de protocolo. Inicialmente utilizando altas doses de reserpina de forma aguda, com doses variando entre 1,0 mg.kg⁻¹ a 5,0 mg.kg⁻¹, os sintomas motores eram bem caracterizados com discinesia e movimentos orais, porém sintomas não-motores não foram avaliados (ABÍLIO et al., 2004; BASKIN; SALAMONE, 1993; SILVA et al., 2002). Posteriormente alguns estudos demonstraram alterações comportamentais nos animais tratados agudamente com doses baixas de

reserpina (0,1, 0,5 e 1,0 mg.kg⁻¹), na ausência de sintomas motores (ALVES et al., 2000; CARVALHO et al., 2006; AGUIAR et al., 2009). Nestes estudos foram identificadas alterações cognitivas, com déficits de curto prazo da memória social, porém ainda sem manifestação de discinesias ou déficits motores, sugerindo a utilidade do modelo da reserpina para avaliação de alterações iniciais que precedem as alterações motoras.

Mais recentemente, Fernandes et al. (2012) e Santos et al. (2013) propuseram uma modificação no modelo da reserpina, utilizando baixas doses (0,1 mg.kg⁻¹) em administrações repetidas (7 a 10 injeções) com intervalo de 48 horas. Estes trabalhos permitiram avaliar a progressividade dos sintomas motores, permitindo o desenvolvimento de outros estudos que avaliaram sintomas não motores e iniciais, inclusive em vias não dopaminérgicas, assim como permitiu simular uma das características marcantes da DP, a cronicidade e progressividade dos sintomas, útil inclusive para testar possíveis drogas neuroprotetoras (LEAL et al., 2019a, 2019b; GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; LEÃO et al., 2015; LINS et al., 2018; BISPO et al., 2019; LINS et al., 2018).

Modelos animais contribuem enormemente para o nosso entendimento da fisiopatologia, potenciais terapêuticos e neuroprotetoras, mas não há um modelo perfeito. Limitações técnicas como toxicidade acentuada e altos custos, assim como mecanismo fisiopatológico do modelo e sua similaridade com a doença humana, devem ser levados em consideração na escolha do modelo adequado a cada necessidade.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar se o tratamento prolongado com reserpina é capaz de mimetizar a natureza progressiva e irreversível da doença de Parkinson em ratos.

São objetivos específicos do trabalho:

- Avaliar as alterações motoras ao longo do tratamento repetido com reserpina.
- Verificar se o aumento do número de injeções é capaz de provocar irreversibilidade das alterações motoras 30 dias após a interrupção do tratamento
- Analisar as alterações funcionais e estruturais nas vias dopaminérgicas no modelo proposto e após a interrupção do tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem *Wistar*, oriundos do biotério setorial do Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Os ratos apresentavam massa corporal variando entre 350g e 500g, com idades entre cinco a sete meses de vida.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) sob condições de ventilação e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) adequadas, com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre a água e comida. Eles ficaram alojados em gaiolas plásticas com dimensões de 33 x 40 x 17 cm (máximo de quatro animais por gaiola). Todos os procedimentos experimentais realizados nesta pesquisa foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da UFS sob o número de protocolo #04/2019. Além disso, os animais foram tratados de acordo com as orientações preconizadas nas leis, decretos, portarias e resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados no presente estudo.

4.2 Drogas

As drogas utilizadas no presente estudo foram: 1) ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR), 99,7%; 2) Reserpina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO); 3) Cloridrato de Cetamina (Ketamina®, Agener União); 4) Cloridrato de Xilazina (Calmiun®, Agener União).

4.3 Procedimentos Gerais

Antes do início dos experimentos, os animais foram submetidos ao procedimento de manipulação por cinco minutos durante cinco dias, com o objetivo de habituá-los à presença e manuseio dos experimentadores, além de tentar diminuir comportamentos do tipo ansioso nos testes comportamentais realizados. Os experimentos foram realizados

preferencialmente no mesmo horário, no turno da manhã. As injeções de reserpina (RES) ou de veículo foram realizadas a cada 48h durante 90 dias, sempre após os testes comportamentais. A RES (0,005 g) foi dissolvida em 50 µl de ácido acético glacial e esta solução foi diluída em 50 ml de água destilada, se tornando uma solução de concentração igual a 0,1 mg/ml. Os grupos controles (CTR e CTR.A) receberam injeção do veículo (50 µl de ácido acético glacial diluído em 50 ml de água destilada). O volume de administração de cada injeção foi de 1 ml/kg.

4.4 Peso Corporal

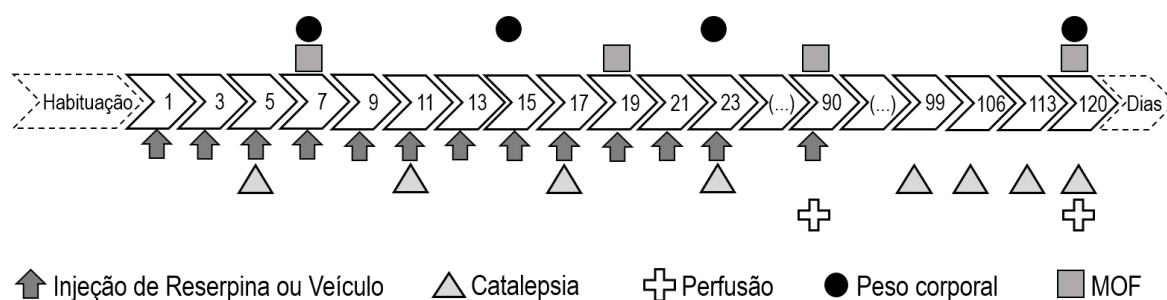
Para acompanhar a variação do peso corporal dos animais ao longo do experimento, o peso dos animais foi aferido a cada 8 dias. Para aferir o peso dos animais, foi utilizada uma balança portátil com cuba, onde os animais foram colocados. Para avaliar a variação do peso corporal, utilizamos a razão $P = [(Pf/Pi) - 1] \times 100$, em que P (peso), Pf (peso final), Pi (peso inicial).

4.5 Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos (8 animais por grupo), sendo: Controle (CTR); Reserpina (RES); Controle e posterior período de abstinência (CTR.A); Reserpina e posterior período de abstinência (RES.A). Todos os animais receberam 45 injeções (via subcutânea) de reserpina (0,1 mg.kg⁻¹) ou veículo, que foram administradas a cada 48h por 90 dias. As injeções foram administradas no subcutâneo na região dorsal do animal, alternando entre dorsal mediana, paramediana direita e paramediana esquerda para evitar irritação ou inflamação no local da injeção. Foram utilizadas agulhas de tamanho 0,45 x 13 mm (26G1/2). No dia 90, os animais dos grupos CTR e RES foram mortos por perfusão transcardíaca, enquanto os animais dos grupos CTR.A e RES.A continuaram no protocolo experimental por mais 30 dias. Contudo a administração das injeções de reserpina ou veículo foi suspensa nesse período (período de abstinência). No dia 120, os animais dos grupos CTR.A e RES.A foram mortos por perfusão transcardíaca. No decorrer do tratamento, os animais foram pesados a cada 4 injeções, a fim de manter um controle do peso dos mesmos e para fins de ajuste de volume de administração das soluções. Ao longo de todo o período de tratamento e também no período de abstinência, os animais foram

submetidos a testes periódicos de comportamento, para caracterizar a presença e a intensidade dos achados de parkinsonismo. O teste de catalepsia foi realizado a cada 3 injeções (a cada 6 dias) até o dia 90 e uma vez por semana no período de abstinência, totalizando 20 testes. As avaliações de movimentos orais foram realizadas, começando após a 4ª. injeção, a cada 15 dias até o dia 90 e ao final do período de abstinência (totalizando 8 testes). A mensuração do peso foi feita a cada 4 injeções e ao final do período de abstinência (13 mensurações). A sequência de testes e mensurações está esquematizada na Figura 4. Após a perfusão, os encéfalos dos animais foram removidos e posteriormente utilizados em análises imunohistoquímicas para tirosina hidroxilase.

Figura 4 - Delineamento experimental. MOF – Movimentos Orais



4.6 Perfusão

A perfusão foi realizada no 90º dia para os animais dos grupos CTR e RES e no 120º dia para os animais dos grupos CTR.A e RES.A. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg.kg⁻¹) e cloridrato de xilazina (10 mg.kg⁻¹) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, foi realizado um acesso, seccionando a pele e partes moles, a cavidade torácica. Após a exposição da cavidade abdominal, foi feita uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais foram perfundidos intracardiacamente com tampão fosfato de sódio (PBS; pH 7,4) para a lavagem dos vasos por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PB; pH 7,4; 100 mM) por 20 minutos, para fixação do tecido.

Após a perfusão, os cérebros foram removidos e mergulhados em uma solução fixadora de sacarose 30% a 4°C.

Após a perfusão dos animais, as carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada. Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital. Os cérebros removidos foram crioprottegidos por uma solução de sacarose 30%, congelados e fatiados em cortes frontais de 50 micrômetros (μm) num criostato de deslizamento (Leica, USA). As secções foram distribuídas em 5 compartimentos contendo solução anticongelante. Cada um dos compartimentos correspondeu a 1 de 5 secções, de maneira que a distância entre ela é de 250 μm . Os cortes foram armazenados em solução anticongelante a base de etilenoglicol e tampão fosfato e conservados a 4°C até as reações de imunohistoquímica (SANTOS et al., 2013; LINS et al., 2018; BISPO et al., 2019; LEAL et al., 2019a; SOUZA et al., 2020).

4.7 Testes Comportamentais

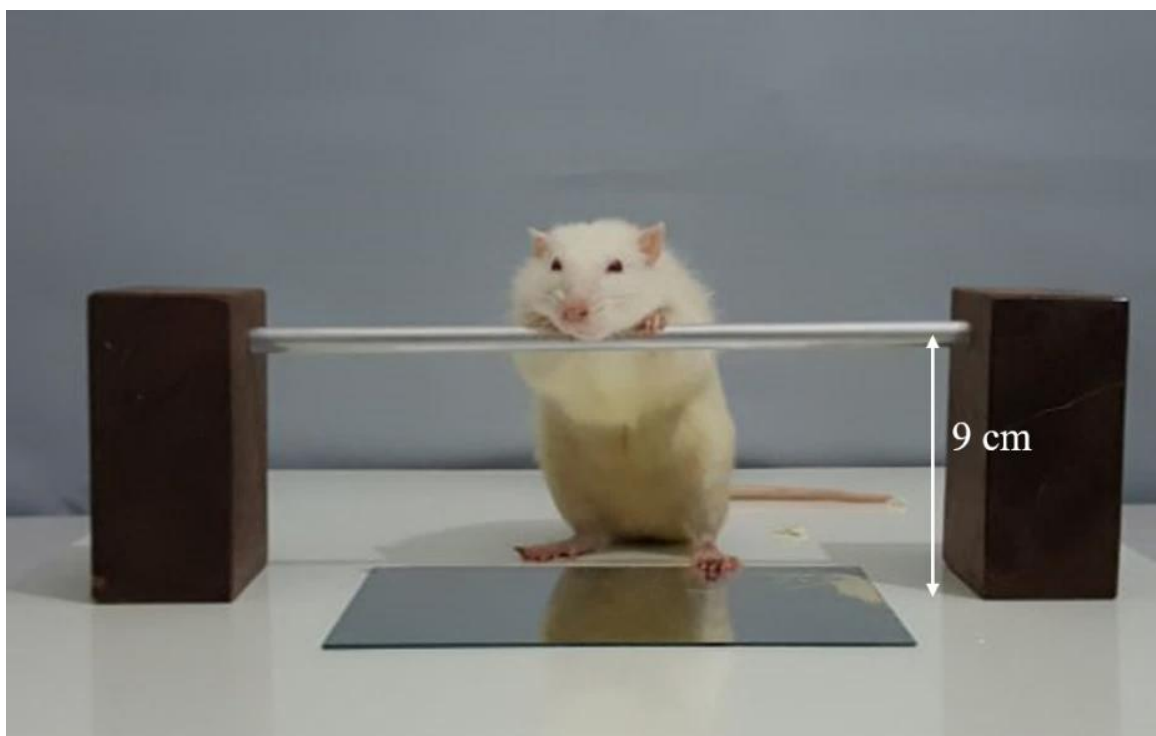
Ao longo do experimento, os animais foram submetidos às seguintes avaliações comportamentais: Teste de catalepsia (realizado a cada 3 injeções de reserpina ou veículo e uma vez por semana no período de abstinência) e Avaliação de Movimentos Orais (realizado a cada 15 dias após a 4ª. injeção de reserpina ou veículo e no dia 120 do experimento).

4.7.1 Teste de Catalepsia

O teste de catalepsia é utilizado para avaliar alterações motoras em modelos animais para doença de Parkinson. O teste avalia o tempo necessário para o animal iniciar o movimento a partir de uma posição imposta pelo experimentador, ou seja, o tempo de latência do movimento (SANBERG et al., 1988). O comportamento de catalepsia é avaliado posicionando as duas patas dianteiras do rato sobre uma barra horizontal a 9,0 cm de altura da plataforma de apoio das patas traseiras (Figura 5). Um cronômetro é acionado

para contagem do tempo de permanência do animal na posição inicial, sendo parado no momento de alteração dessa posição (realização de movimentos com as patas dianteiras para sair da posição imposta inicialmente). Foram realizadas três tentativas consecutivas, com tempo limite de 180 segundos para cada uma delas. O teste foi realizado a cada 3 injeções de reserpina ou veículo e uma vez por semana no período de abstinência e, para cada dia, foi feita uma média das três tentativas (SANTOS et al., 2013).

Figura 5 - Representação ilustrativa do teste de catalepsia. Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS).



4.7.2 Movimentos Orais

A avaliação dos movimentos orais foi realizada colocando-se os animais em uma gaiola gradeada (29 cm x 24 cm x 21 cm) onde foram observados durante 10 minutos (Figura 6). Para a melhor observação, espelhos foram fixados abaixo e atrás das gaiolas, permitindo que o observador visualizasse o animal em qualquer posição. Foram quantificados: (1) o número de protrusões de língua (projeção da língua para fora da

cavidade oral); (2) o número de movimentos de mastigação (movimentos rápidos da mandíbula, que se assemelham a mastigação, mas não são direcionados a nenhum estímulo específico - *vacuous chewing movements*) e (3) a duração de tremores de queixo em segundos (espasmos da musculatura da face) (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEAL et al., 2019b).

Figura 6 - Representação ilustrativa da avaliação de movimentos orais. Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS).



4.8 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase

Os procedimentos da imunohistoquímica seguiram protocolo já estabelecido no nosso laboratório. Em temperatura ambiente (22°C), as secções cerebrais foram lavadas (quatro vezes por cinco minutos sob agitação automática) em solução de PBS (tampão fosfato salino) e triton (0,3%) após cada etapa de exposição aos reagentes. As secções de um compartimento de cada animal foram 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 um anticorpo primário monoclonal anti-TH produzidos 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 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 3-diaminobenzidina (DAB) por seis minutos (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em tampão fosfato - PB (0,1M / pH 7,4) e 0,01% de H₂O₂ (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEAL et al., 2019b).

4.9 Aquisição de Imagem

Após a imunohistoquímica, os cortes foram então montados em lâminas previamente gelatinizadas e, em seguida, foram intensificadas em solução de tetróxido de ósmio 0,006% e posteriormente desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de álcoois, clareadas com xilol, e as lamínulas fixadas com Entellan (Merck). As secções foram examinadas por iluminação de campo claro (Olympus Microscope, BX-41) e as imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital (Nikon, DXM-1200) acoplada ao microscópio e programa específico para essa finalidade (Imaging Software NIS Elements, Nikon, versão 4.30). As localizações das áreas foram determinadas usando o atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2017).

4.10 Contagem de Células

Para cada animal foram feitas imagens dos cortes em aumento de 100x (objetiva de 10x), nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem de célula foi realizada em 4 secções de cada animal (5 animais por grupo) e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. As áreas analisadas foram SNpc e VTA. Todas as células imunorreativas a TH⁺ nas áreas de interesse foram contadas utilizando o *software*

Image J (versão 1.6.0, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2017). Todas as contagens foram realizadas de forma “cega”, de forma que 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 (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEAL et al., 2019b).

4.11 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 do estriado dorsal, as quais foram analisadas utilizando o *software* Image J (versão 1.6.0, NIH). Na mesma imagem também foi selecionado um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação no tecido. O número médio de pixels calculados nos campos de interesse foi subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle.

4.12 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e apresentaram distribuição normal para todas as variáveis, então foram aplicados testes paramétricos apropriados. Os dados comportamentais do teste de catalepsia, movimentos orais e peso corporal foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados de contagem de células e DOR foram submetidos a ANOVA de uma via seguida do pós-teste LSD. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas através do *software* Graph Pad Prism versão 6.0 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

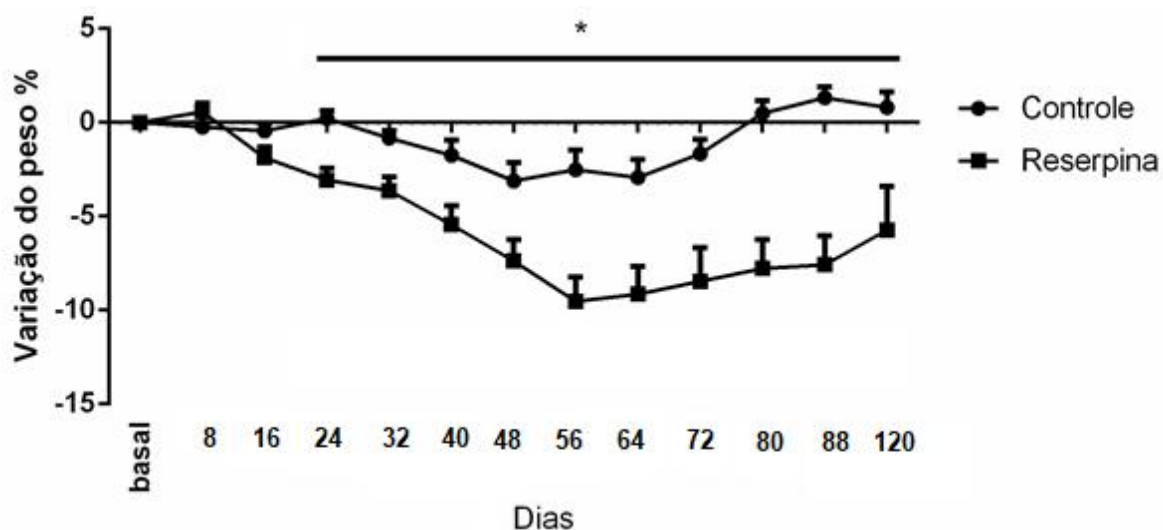
5 RESULTADOS

Os dados obtidos na primeira fase do experimento (até o dia 90) dos grupos CTR e CTR.A, assim como RES e RES.A, foram agrupados (em todas as avaliações realizadas), visto que ambos receberam exatamente o mesmo tratamento sob o mesmo protocolo neste período, com o objetivo de facilitar o entendimento dos resultados. Ressaltamos que as análises dos dados foram realizadas em dois blocos, sendo o primeiro do dia 0 ao 90 e o segundo bloco do dia 90 ao 120 (período de abstinência). Porém, para melhor visualização dos resultados, os dois gráficos foram unidos numa única imagem.

5.1 Variação do Peso

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(11,286) = 25,15$, $p < 0,0001$], tratamento [$F(1, 26) = 17,64$, $p = 0,0003$] e interação tempo x tratamento [$F(11,286) = 12,95$, $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que a partir do dia 24 (após a 12^a. injeção) o grupo RES apresentou um peso menor quando comparado ao grupo CTR ($p^{24} = 0,0140$; $p^{32} = 0,0358$; $p^{40} = 0,0058$; $p^{48} = 0,0015$; $p^{56} < 0,0001$; $p^{64} < 0,0001$; $p^{72} < 0,0001$; $p^{80} < 0,0001$; $p^{88} < 0,0001$; $p^{120} < 0,0217$), conforme demonstrado na Figura 7.

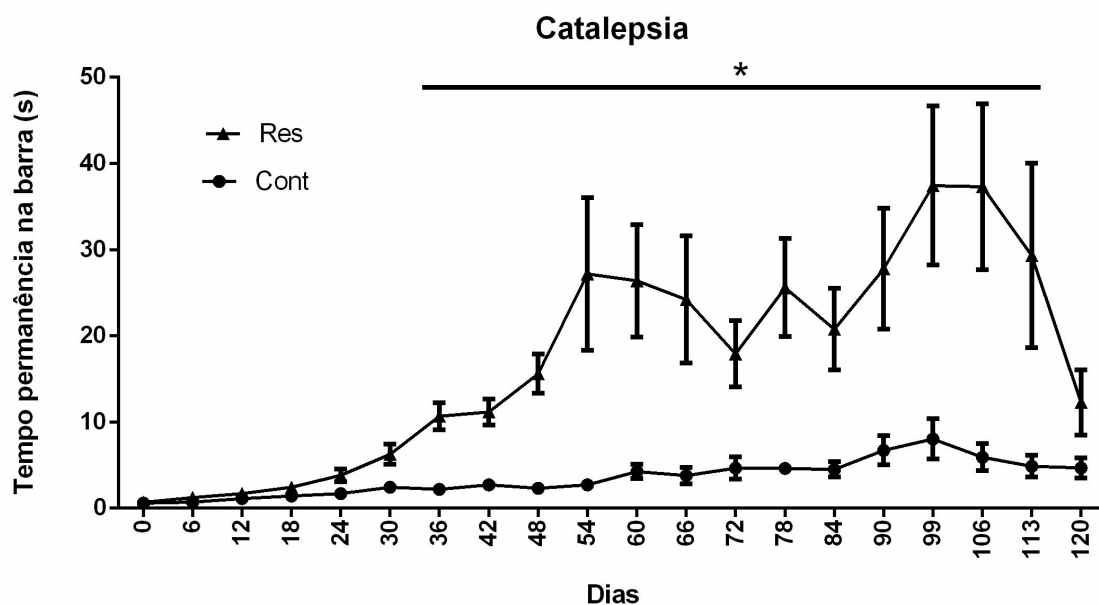
Figura 7- Efeito da administração repetida de reserpina sobre a variação do peso corporal. A reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi capaz de causar redução significativa do peso dos animais ao longo do experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD)



5.2 Resultados do comportamento de catalepsia

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(15,195) = 9,853$, $p < 0,0001$], tratamento [$F(1, 13) = 18,29$, $p = 0,0009$] e interação tempo x tratamento [$F(15,195) = 5,871$, $p < 0,0001$] para o bloco de 0 a 90. Assim como efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(3, 18) = 6,216$, $p = 0,0044$], tratamento [$F(1, 6) = 8,720$, $p = 0,0255$] e interação tempo x tratamento [$F(3, 18) = 3,380$, $p = 0,0411$] para o bloco de 90 a 120 (abstinência). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que a partir do dia 36 (após a 18ª. injeção) o grupo RES apresentou um maior tempo de permanência na barra quando comparado ao grupo CTR ($p^{36} = 0,0235$; $p^{42} = 0,0240$; $p^{48} = 0,0004$; $p^{54} < 0,0001$; $p^{60} < 0,0001$; $p^{66} < 0,0001$; $p^{72} = 0,0004$; $p^{78} < 0,0001$; $p^{84} < 0,0001$; $p^{90} < 0,0001$; $p^{99} = 0,0001$; $p^{106} < 0,0001$; $p^{113} = 0,0002$). Entretanto no dia 120 (última medida) não houve diferença significativa ($p^{120} = 0,2211$), conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8- Efeito da administração repetida de reserpina sobre alterações motoras no comportamento de catalepsia. A reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi capaz de causar comportamento cataléptico progressivo, nos animais, ao longo do experimento. Esse comportamento foi reversível após a interrupção das administrações de reserpina. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD)



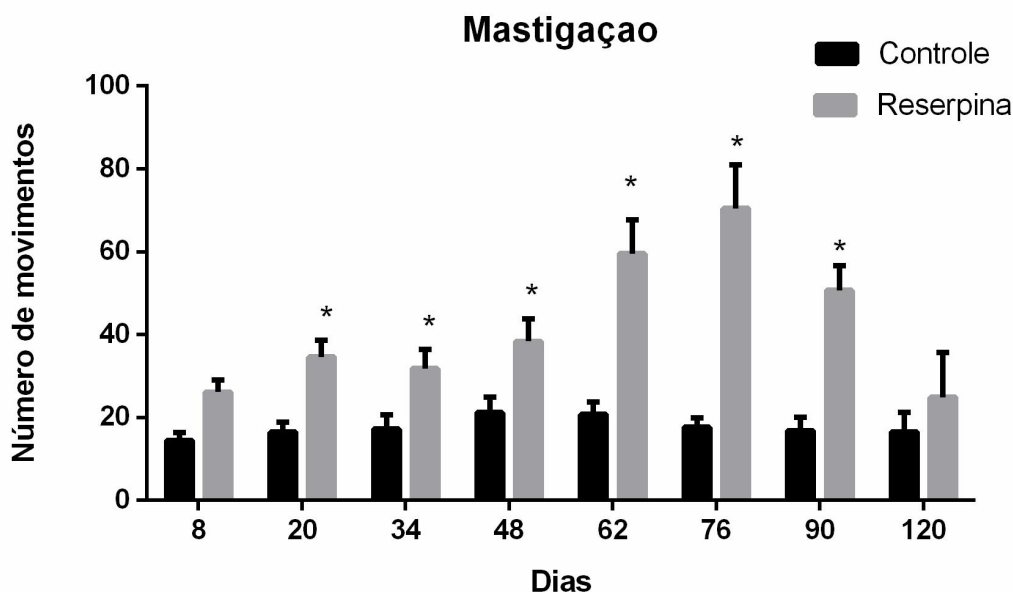
5.3 Resultados do teste de movimentos Oraís

O teste de movimentos Oraís foi segmentado nas variedades do movimento executado: movimentos de mastigação, movimentos de protrusão do mento e tremor de mandíbula. Estes testes foram submetidos a análise estatística separadamente.

5.3.1 Movimentos Oraís – Mastigação

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(6,78) = 6,809$, $p < 0,0001$], tratamento [$F(1, 13) = 64,33$, $p < 0,0001$], e da interação tempo x tratamento [$F(6, 78) = 5,225$, $p < 0,0001$] para o bloco de 0 a 90. As medidas feitas no dia 120 (abstinência) não demonstraram diferença significativa na avaliação pelo teste Mann Whitney ($p = 0,8776$). Na Figura 9, podemos observar que o pós-teste de Fisher's LSD mostrou que a partir do dia 20 (após a 10^a. injeção) o grupo RES apresentou um maior número de movimentos orais do tipo mastigação quando comparado ao grupo CTR ($p^{20} = 0,0085$; $p^{34} = 0,0331$; $p^{48} = 0,0126$; $p^{62} < 0,0001$; $p^{76} < 0,0001$; $p^{90} < 0,0001$). Entretanto no dia 120 (última medida) não houve diferença significativa ($p^{120} = 0,8776$).

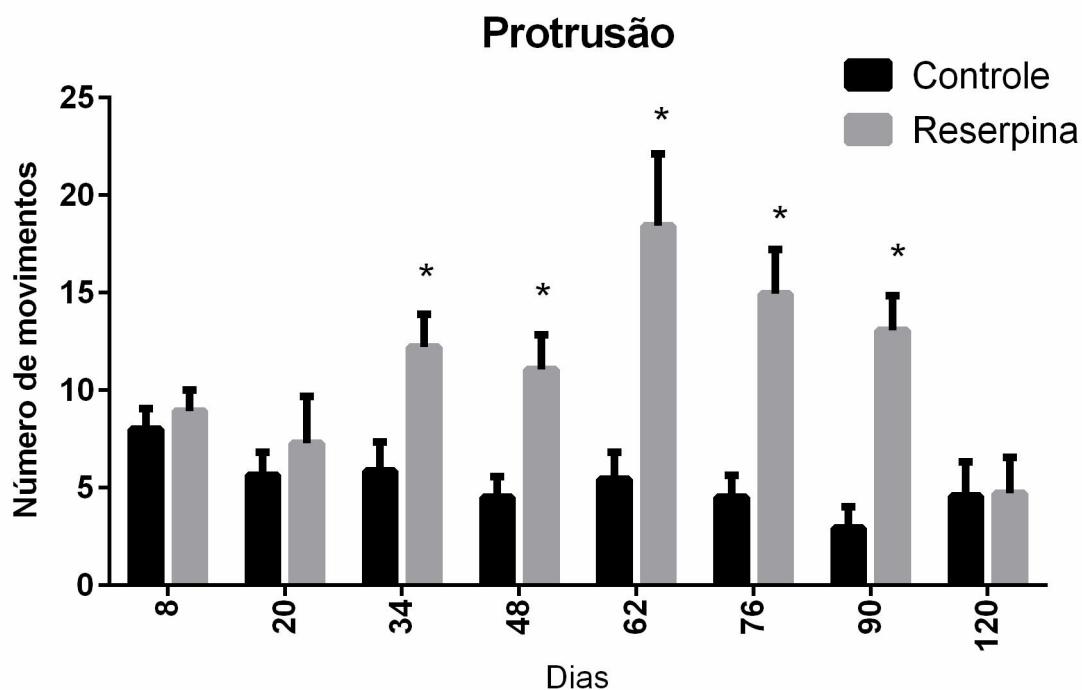
Figura 9 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de movimentos orais – tipo mastigação. A reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi capaz de causar aumento progressivo do comportamento de mastigação, nos animais, ao longo do experimento. Esse comportamento foi reversível após a interrupção das administrações de reserpina. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD)



5.3.2 Movimentos Orais – Protrusão

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(6,78) = 2,370$, $p = 0,0370$], tratamento [$F(1, 13) = 25,37$, $p = 0,0002$], e da interação tempo x tratamento [$F(6, 78) = 5,074$, $p = 0,0002$] para o bloco de 0 a 90. As medidas feitas no dia 120 (abstinência) não demonstraram diferença significativa na avaliação pelo teste Mann Whitney ($p = 0,9207$). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que a partir do dia 34 (após a 17ª. injeção) o grupo RES apresentou um maior número de movimentos orais do tipo protrusão da língua quando comparado ao grupo CTR ($p^{34} = 0,0023$; $p^{48} = 0,0017$; $p^{62} < 0,0001$; $p^{76} < 0,0001$; $p^{90} < 0,0001$). Entretanto no dia 120 (última medida) não houve diferença significativa ($p^{120} = 0,9207$), conforme demonstrado na Figura 10.

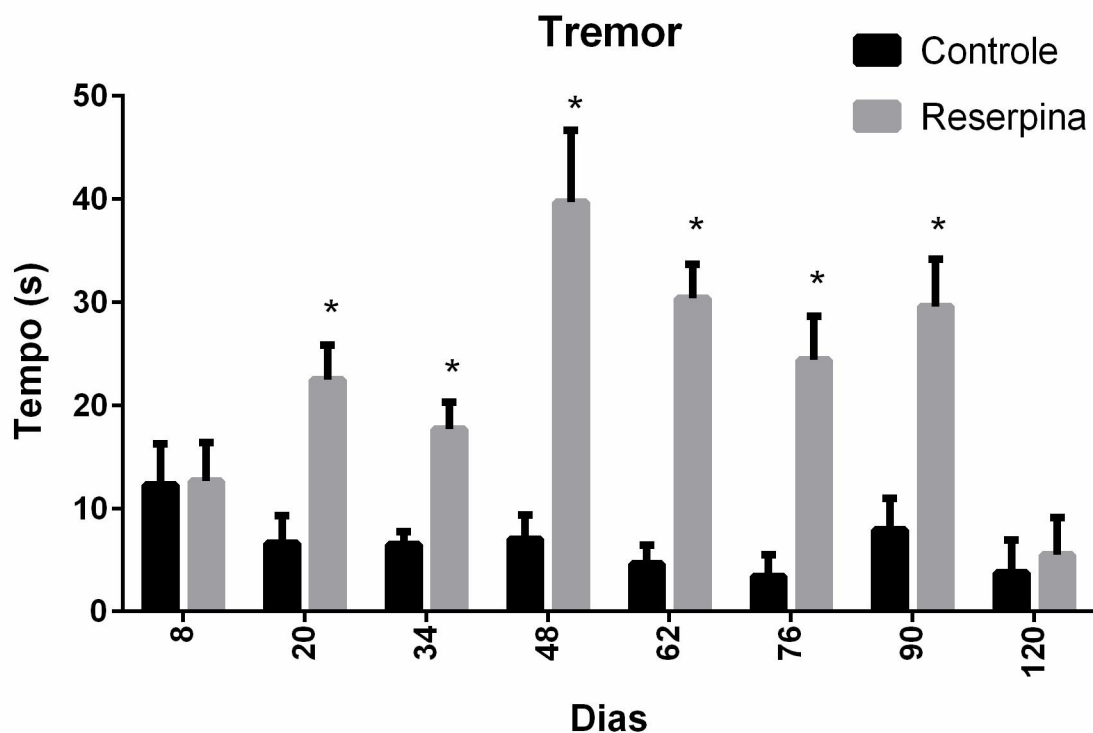
Figura 10 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de movimentos orais – tipo protrusão. A reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi capaz de causar aumento progressivo do comportamento de protrusão de língua, nos animais, ao longo do experimento. Esse comportamento foi reversível após a interrupção das administrações de reserpina. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD)



5.3.3 Movimentos Oro-Faciais – Tremor

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(6,78) = 2,391$, $p = 0,0358$], tratamento [$F(1, 13) = 91,45$, $p < 0,0001$], e da interação tempo x tratamento [$F(6, 78) = 5,019$, $p = 0,0002$] para o bloco de 0 a 90. As medidas feitas no dia 120 (abstinência) não demonstraram diferença significativa na avaliação pelo teste Mann Whitney ($p = 0,8531$). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que a partir do dia 20 (após a 10^a. injeção) o grupo RES apresentou uma maior quantidade de movimentos orais do tipo tremor do queixo quando comparado ao grupo CTR ($p^{20} = 0,0011$; $p^{34} = 0,0193$; $p^{48} < 0,0001$; $p^{62} < 0,0001$; $p^{76} < 0,0001$; $p^{90} < 0,0001$). Entretanto no dia 120 (última medida) não houve diferença significativa ($p^{120} = 0,8531$), conforme demonstrado na Figura 11.

Figura 11 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre os movimentos orais – tipo tremor. A reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi capaz de causar aumento progressivo do tremor oral, nos animais, ao longo do experimento. Esse comportamento foi reversível após a interrupção das administrações de reserpina. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo controle. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD)

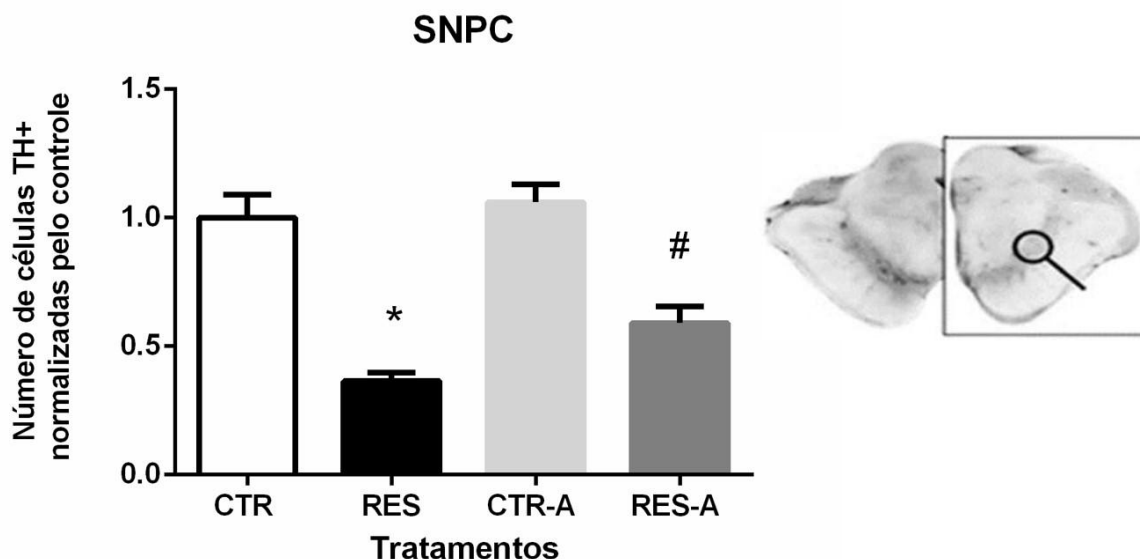


5.4 Contagem de Células

5.4.1 Contagem de Células Substância Negra *Pars Compacta* (SNpc)

A ANOVA uma via revelou efeito do tratamento [$F(3,16) = 24,56$, $p < 0,0001$], com diferença significativa para o número de células TH+ na SNpc entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa no número de células TH+ na SNpc quando comparados os grupos CTR e RES ($p < 0,0001$) e CTR.A e RES.A ($p = 0,0001$), assim como também no grupo RES e RES.A ($p = 0,0299$) conforme Figura 12.

Figura 12 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de células TH+ na SNpc. 45 injeções de reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), em dias alternados, causaram uma redução na imunorreatividade para TH na SNpc, que não foi reversível 30 dias após a última injeção. Os dados foram normalizados pelo controle e expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo CTR e $p\# < 0,05$, comparado ao grupo CTR-A. (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Fisher's LSD)

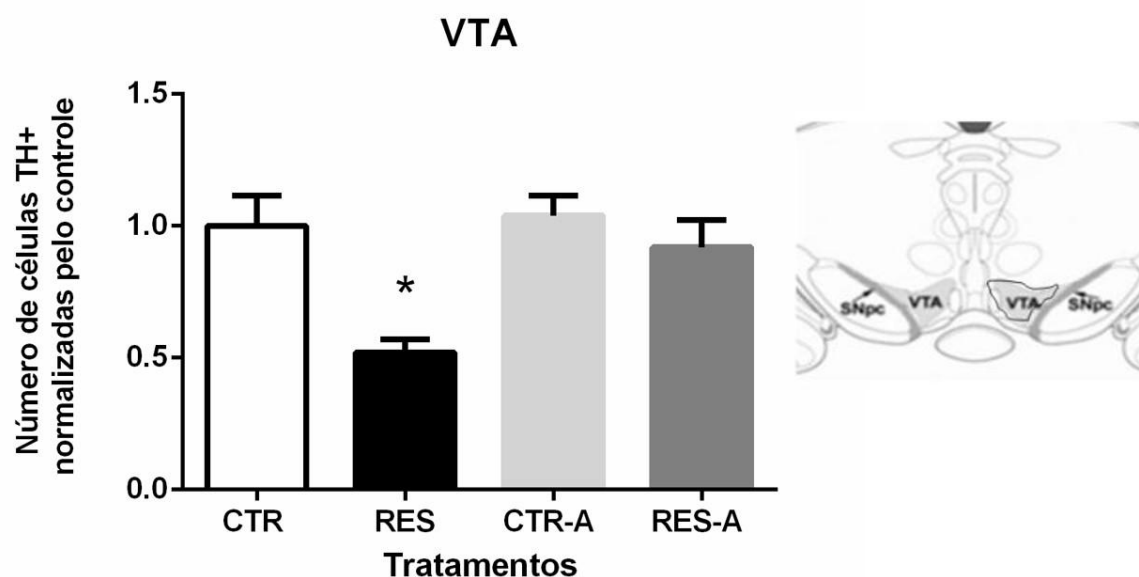


5.4.2 Contagem de Células Área Tegmentar Ventral (VTA)

A ANOVA uma via revelou efeito do tratamento [$F(3,16) = 7,253$, $p = 0,0027$], com diferença significativa para o número de células TH+ em VTA entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa no número de células TH+ em VTA quando comparados os grupos CTR e RES ($p = 0,0015$), CTR.A e

RES ($p=0,0008$) e RES e RES.A ($p=0,0057$) conforme Figura 13. Entretanto não se verificou diferença significativa entre o número de células TH+ quando comparados os grupos CTR.A e RES.A ($p=0,3525$).

Figura 13 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre o número de células TH+ em VTA. 45 injeções de reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), em dias alternados, causaram uma redução na imunorreatividade para TH em VTA. Essa alteração foi revertida 30 dias após a última injeção. Os dados foram normalizados pelo controle e expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo CTR e $p\# < 0,05$, comparado ao grupo CTR-A. (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Fisher's LSD)



5.5 Resultado da Densitometria Óptica Relativa (DOR)

A ANOVA uma via revelou efeito do tratamento [$F(3,16) = 4,237$, $p = 0,0220$], com diferença significativa para a densidade óptica relativa no estriado dorsal entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa nos valores da densidade quando comparados os grupos CTR e RES ($p=0,0243$) e CTR.A e RES.A ($p=0,0233$) como demonstrado na Figura 14. Entretanto não se verificou diferença significativa entre os valores de densidade no estriado quando comparados os grupos RES e RES.A ($p=0,7428$).

Figura 14 - Efeito da administração repetida de reserpina sobre a imunorreatividade para TH no Estriado Dorsal. 45 injeções de reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), em dias alternados, causaram uma redução na imunorreatividade para TH no Estriado Dorsal, que não foi reversível 30 dias após a última injeção. Os dados foram normalizados pelo controle e expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\pm \text{E.P.M.}$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p^* < 0,05$, comparado ao grupo CTR e $p^\# < 0,05$, comparado ao grupo CTR-A. (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Fisher's LSD)

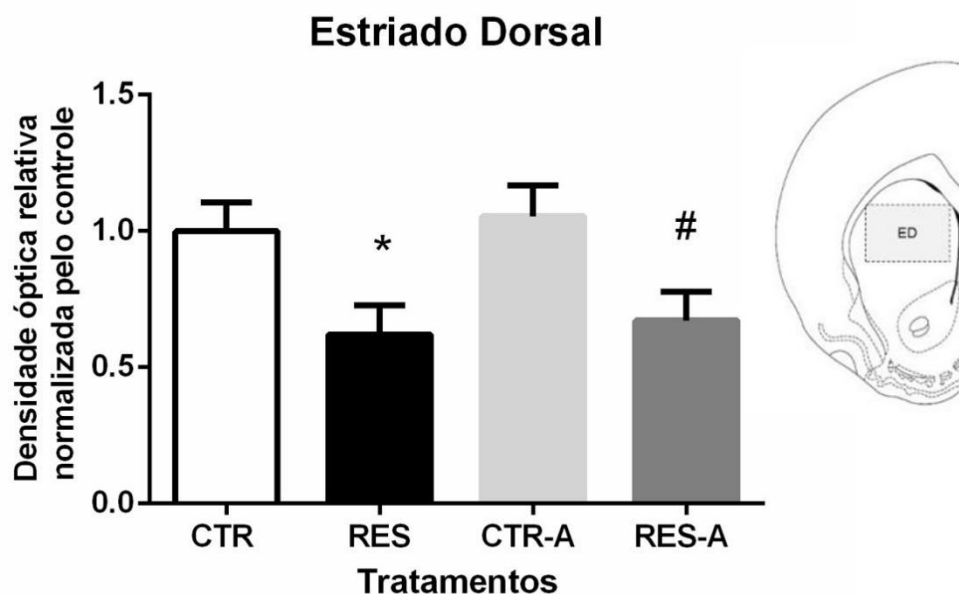
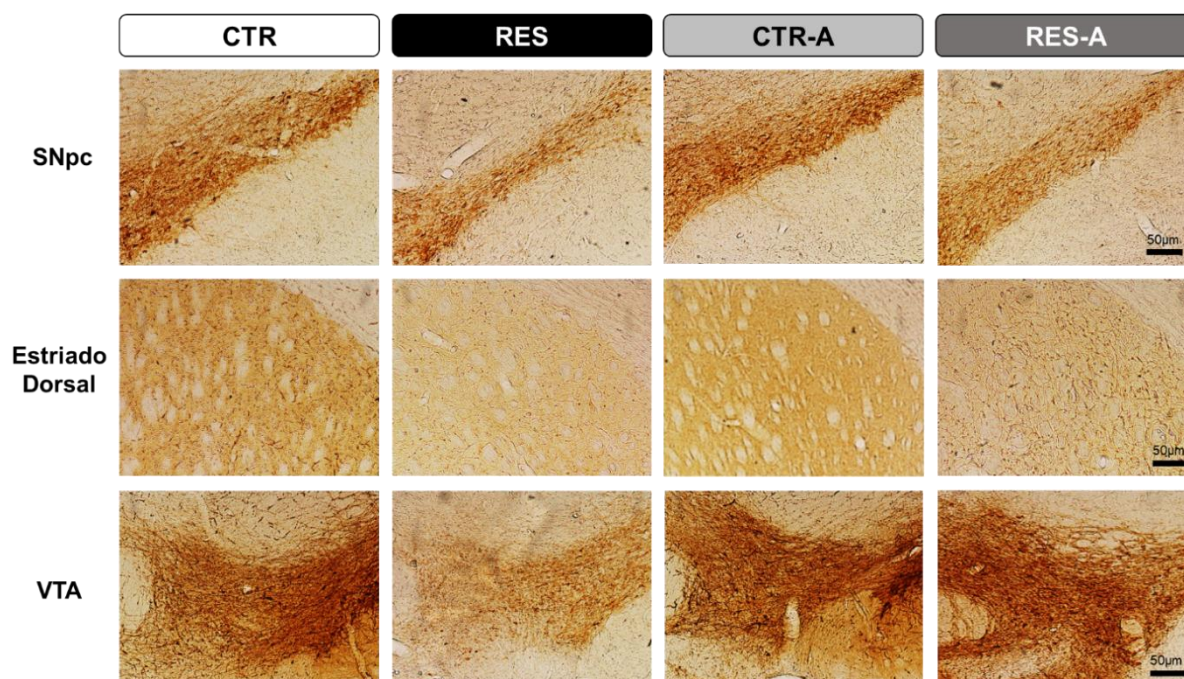


Figura 15 – Imagens ilustrativas do efeito da administração repetida de reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) sobre a imunorreatividade para TH na SNpc, VTA e estriado Dorsal, após 45 injeções (CTR e RES) e 30 dias após a última injeção (CTR.A e RES.A).



6 DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos se o tratamento prolongado com reserpina é capaz de mimetizar a natureza progressiva e irreversível da doença de Parkinson em ratos, utilizando um modelo animal de parkinsonismo induzido por administrações repetidas de baixas doses de reserpina ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$). Observamos que o tratamento prolongado com reserpina determinou nos animais tratados em relação a seus controles uma redução do peso corporal, maior tempo de permanência na barra e maior número de movimentos orais dos tipos mastigação, protrusão da língua e tremor. Os animais que foram submetidos a um período de 30 dias de abstinência do tratamento reserpina mantiveram uma redução no peso no dia 120 em relação ao controle, porém não houve diferença significativa no número de movimentos orais tipo mastigação, protrusão ou tremor nem no tempo de permanência na barra, indicando parcial reversibilidade dos achados.

Em relação às análises morfológicas, observamos redução no número de células TH+ na SNpc e em VTA nos animais tratados em relação a seus controles, e também redução no número de células TH+ no grupo RES em relação ao grupo RES.A, indicando parcial reversibilidade do tratamento após abstinência. A densitometria do estriado dorsal demonstrou redução da densidade nos grupos tratados em relação aos controles (CTR x RES e CTR.A x RES.A). Não houve diferença significativa entre os grupos RES e RES.A indicando que o efeito do tratamento permanece mesmo após o período de abstinência.

Nosso estudo demonstra uma redução do peso estatisticamente significativa nos animais tratados com reserpina em relação a seus controles a partir do dia 24 (após décima segunda injeção) que permanece em todas as medições subsequentes, inclusive durante o período de abstinência. Essa redução do peso em animais tratados com reserpina está de acordo com o encontrado na literatura (SANTOS, 2012; FAVERO et al., 2017; WELLS et al., 2017; MELO, 2020). A perda de peso relatada nos estudos de Favero et al. (2017) e Wells et al. (2017) ocorre de forma mais aguda e está relacionada a altas doses de reserpina ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) em até três injeções, em um protocolo experimental para estudo de fibromialgia. Em protocolo de baixa dose, Santos (2012) e Melo (2020) observam uma perda de peso gradual e contínua ao longo do período de injeções repetidas. Embora Fernandes et al (2012) não tenha encontrado diferença na variação do peso entre animais tratados com reserpina e os não tratados, acreditamos que esta diferença deve-se ao

protocolo utilizado, visto que, no nosso estudo e no de Santos (2012), a diferença surge após o 20º. a 24º. dia e, no estudo de Fernandes et al (2012), os animais são mortos no dia 22. Durante o período de abstinência, nota-se persistência da diferença de peso com redução da diferença, aproximando-se dos valores do controle no último dia avaliado, demonstrando uma tendência a recuperação dos efeitos da droga. Este achado também é consistente com os encontrados por Santos (2012), em que a diferença de peso começa a partir do dia 20 (após a 10 a. injeção) e persiste durante o período de abstinência até o dia 44, porém não mais se observa diferença significativa na última medida (dia 50).

Alguns estudos têm demonstrado perda de peso em animais (ratos) também em outros modelos de parkinsonismo, tais como no modelo da 6-OHDA e do MPTP (CASAS et al., 2000; FERRO et al., 2005). Segundo Ferro (2005), tanto a 6-OHDA quanto o MPTP causam uma significativa perda de células imunoreativas a tirosina hidroxilase em SN e depleção da dopamina no estriado. Após a lesão da 6-OHDA, além da dopamina, também foram depletados noradrenalina e, às vezes, 5-hidroxidopamina. Como a lesão de MPTP é mais seletiva para depletar dopamina, os estudos que relatam perda de peso sugerem lesão nigroestriatal e, em alguns casos, das vias mesolímbica ou mesocortical. Em Ferro (2005), sugere-se uma relação entre a perda de peso nos animais tratados com 6-OHDA e MPTP e a mortalidade e portanto toxicidade do modelo. Entretanto no nosso estudo não houve morte / perda de nenhum animal e ainda assim foi verificada perda de peso sugerindo um mecanismo relacionado à depleção dopaminérgica. Concordante a esta ideia, Casas (2000) relata ação de receptores dopaminérgicos, notadamente receptores D2 pós-sinápticos, em comportamentos de alimentação e ingestão de líquido. Casas (2000) também sugere que a perda de peso pode estar relacionada ao componente de motivação para busca de alimento. Perda de motivação e de apetite também é indicada em estudos recentes (SCHULTZ, 2016; XIE et al., 2018) como causa da perda de peso no tratamento com a reserpina. Acreditamos que isso pode estar relacionado a alteração em outras vias dopaminérgicas, que não a clássica via nigroestriatal que é relacionada ao movimento. As alterações nas demais vias dopaminérgicas (mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular) têm sido cada vez mais pesquisadas, uma vez que alguns estudos relatam que o processo degenerativo compromete estruturas dopaminérgicas extraestriatais e que estas podem estar relacionadas com ocorrências dos sintomas não-motores (FERNANDES et al., 2008, 2012; SANTOS et al., 2013; LEÃO et al., 2015b; LEAL et al., 2016b, 2019a). Adicionalmente, no presente

estudo observamos uma redução na imunoreatividade para TH em VTA, o que corrobora essa hipótese.

Estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (ABRITTA et al., 2018) avaliaram uma das vias dopaminérgicas, a via tuberoinfundibular, demonstrando que houve uma diminuição no número de células reativas a TH nas áreas hipotalâmicas para e periventriculares a partir da décima injeção de reserpina. Os resultados do presente estudo corroboram esta hipótese, tendo em vista que há uma diminuição no número de células TH+ nas áreas hipotalâmicas para e periventriculares a partir da décima injeção de reserpina. A via tuberoinfundibular origina-se no núcleo arqueado do hipotálamo e projeta-se para a hipófise regulando a secreção de hormônios (ANDREWS; KOKAY; GRATTAN, 2001). Há relatos de deficiência da função hipotalâmica (PRAKASH et al., 2016) em pacientes com DP e acredita-se que as alterações autonômicas, endócrinas e do sono estejam ligadas à degeneração dos neurônios dopaminérgicos desta região (POLITIS et al., 2008).

O teste de catalepsia tem sido amplamente utilizado para comprovar alterações motoras em inúmeros modelos animais para DP. O teste consiste em avaliar o tempo de imobilidade do animal quando colocamos suas patas dianteiras em uma barra fixa, ou seja, avaliamos o tempo de latência para o início do movimento, que é uma característica típica do parkinsonismo (BEAL, 2001; DUTY; JENNER, 2011; FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEÃO et al., 2015; GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; LINS et al., 2018; LEAL et al., 2019b; MELO, 2020).

Em nosso trabalho observamos aumento do tempo na catalepsia de forma estatisticamente significativa em relação ao controle a partir da 18ª. injeção (dia 36) que persistiu ao longo das medições subsequentes, inclusive no período de abstinência, exceto na última medição (dia 120) quando não há mais diferença significativa com o controle. Estes dados são compatíveis com a literatura (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEAL et al., 2019b), demonstrando um aumento gradual do tempo de permanência na barra com o aumento dos dias de tratamento com baixas doses e reversibilidade dos achados após a interrupção do tratamento (SANTOS et al., 2013; MELO, 2020). O maior tempo de tratamento determinou um maior tempo necessário para que os animais demonstrassem recuperação após a interrupção da droga. Enquanto Santos et al. (2013) utilizou um protocolo crônico de baixas doses de reserpina com número de 10 injeções e

30 dias de abstinência, em nosso estudo utilizamos um maior tempo de exposição às baixas doses de reserpina (mesma dose $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) com um total de 45 injeções e um período de abstinência também de 30 dias. O estudo de Melo (2020) utilizou o protocolo de baixa dose ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) com 15 injeções e 30 dias de abstinência em animais adultos e idosos e demonstrou reversibilidade das alterações motoras nos dois grupos embora com um tempo mais prolongado para recuperação nos animais idosos.

Acreditávamos que, com um maior tempo de exposição a droga, 90 dias, conseguiríamos demonstrar a irreversibilidade dos achados de alterações motoras demonstrados pela catalepsia, dado que já havia sido documentada a característica de progressividade dos achados com menor números de injeções. Entretanto, isso não se confirmou, visto que a última medição, no dia 120, mostrou recuperação dos animais com tempo de catalepsia similar (sem diferença significativa) ao dos animais controles. Estes achados são consistentes também com estudos prévios realizados com tratamento com reserpina em doses mais elevadas ($1,0$ a $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) que mostram efeitos reversíveis após o final do tratamento (HEERINGA; ABERCROMBIE, 1995; DUTY; JENNER, 2011).

Um outro teste comportamental utilizado para avaliar alterações motoras é a avaliação dos movimentos orais. Nesse estudo os animais são posicionados em gaiola com espelhos e são contabilizados o número de movimentos orais por um período de 10 minutos. Estes movimentos são separados em três categorias: protrusão da língua (projeção da língua para fora da cavidade oral), mastigação (movimentos rápidos da mandíbula, que se assemelham a mastigação, mas não são direcionados a nenhum estímulo específico) e tremor (espasmos da musculatura da face) (BASKIN; SALAMONE, 1993; FERNANDES et al., 2012; SANTOS, 2012; LINS et al., 2018; LEAL et al., 2019b). Estes movimentos orais são involuntários, uma importante característica para avaliação motora em um modelo experimental de Parkinson, ao contrário do teste de catalepsia, que envolve um componente voluntário, podendo ser afetado por motivação ou aprendizagem (NEISEWANDER; LUCKI; MCGONIGLE, 1991).

Baskin e Salamone (1993) demonstraram que o aumento do número de movimentos orais do tipo mastigação em ratos tratados com reserpina em altas doses ($1,25$ a 5 mg.kg^{-1}) estava relacionado com a depleção de dopamina. Os movimentos orais apresentam similaridades com os tremores dos humanos e têm sido usados para avaliar a eficácia de tratamentos antiparkinsonianos em humanos (SALAMONE et al., 1998). No presente

estudo, observamos um aumento significativo do número de movimentos orais a partir do dia 20 (após a 10^a. injeção) em todas as três categorias avaliadas (protrusão, mastigação e tremor) em relação aos controles. Estes achados são concordantes com artigos recentes que utilizaram o protocolo experimental de baixa dose de reserpina (0,1 mg.kg⁻¹). Fernandes et al. (2012) demonstra alteração a partir do dia 21, Lins et al. (2018) a partir do dia 12 com pico no dia 20 e Santos (2012) a partir do dia 12. Leal et al. (2019) não observou diferença significativa no dia 06, o que é corroborado pelos nossos dados, uma vez que não observamos alterações nessa fase inicial do experimento. Em nosso estudo, 30 dias após a última injeção, não se observa diferença significativa em relação aos controles, indicando reversibilidade das alterações. Esta recuperação da alteração motora oral também foi observada por Santos (2012), após 30 dias de abstinência para os movimentos de mastigação e tremor e após 15 dias para o movimento de protrusão. Não obstante, Neisewander et al. (1991) demonstrou irreversibilidade nos movimentos de protrusão da língua por ao menos 60 dias após a interrupção do tratamento com reserpina. Neste estudo foi utilizado protocolo de alta dose de reserpina (1,0 mg.kg⁻¹) em injeções diárias por 15 dias consecutivos, obtendo-se alterações significativas dos movimentos orais a partir do terceiro dia de tratamento, que foram persistentes após o período de interrupção da droga. Hipotetizamos que um possível aumento da dose de reserpina para valores intermediários (superior a 0,1 mg.kg⁻¹ e inferior a 1,0 mg.kg⁻¹) poderia alcançar ambos os objetivos de permitir o surgimento gradual dos sintomas motores, útil na avaliação inicial da doença, e também promover a irreversibilidade dos achados.

As alterações comportamentais observadas no presente estudo são acompanhadas de uma redução da imunorreatividade para TH em áreas motoras (SNpc e Estriado Dorsal) e em VTA (área do sistema límbico), 48h após a 45^a injeção de reserpina. Resultados semelhantes foram observados por Fernandes et al. (2012), Santos et al. (2013), Leão et al. (2017), Lins et al. (2018), Bispo et al. (2019) e Melo (2020). A avaliação feita após o período de abstinência permite identificar que ainda há redução do número de células TH+ no grupo RES.A no ED e na SNpc, apesar de notarmos recuperação no grupo RES.A em VTA. Apesar da reversibilidade das alterações motoras na catalepsia e nos testes de movimentos orais observadas no presente estudo, 30 dias após a última injeção de reserpina, os animais ainda apresentaram uma redução na imunorreatividade para TH das áreas motoras estudadas (SNpc e Estriado Dorsal). No estudo de Santos et al. (2013), quando foram administradas apenas 10 injeções de reserpina (0,1 mg.kg⁻¹), 30 dias após a

última injeção essas duas áreas motoras apresentaram uma reversibilidade parcial na imunoreatividade para TH. Isso indica que, possivelmente, o aumento do número de injeções pode ter causado uma lesão dopaminérgica maior na via nigroestriatal. Existe uma aparente dissociação entre os achados motores, já recuperados após o período de abstinência de 30 dias, e os achados morfológicos na via nigroestriatal, caracterizados pela permanência da redução da imunoreatividade nas áreas motoras. Hipotetizamos que a ausência de alterações motoras observadas nos testes aplicados 30 dias após a última injeção pode estar relacionada a possíveis alterações plásticas no sistema periférico de processamento motor, que é capaz de manter as atividades motoras estudadas, mesmo frente a uma redução de dopamina no sistema nervoso central. Nesse sentido, fazem-se necessários novos experimentos para investigar os desdobramentos dos achados do presente estudo.

7 CONCLUSÃO

O aumento do tempo de exposição à reserpina não foi capaz de induzir irreversibilidade dos achados motores. Entretanto, essa reversibilidade não é observada na avaliação morfológica da via nigroestriatal. Dessa forma, concluímos que o modelo proposto é útil para avaliar alterações comportamentais motoras progressivas e alterações dopaminérgicas iniciais, mas não é adequado para simular a característica de irreversibilidade dos sintomas motores próprios da DP. Novos estudos com aumento da dose de reserpina, avaliação de morte celular e avaliações de alterações plásticas no sistema motor periférico podem ser necessários para caracterizar melhor o presente modelo.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. C. et al. Important Role of Striatal Catalase in Aging- and Reserpine-Induced Oral Dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 2, p. 263–272, ago. 2004.
- ABRITTA, R. T. R. et al. Administração repetida de reserpina induz redução do peso corporal e alterações da via tuberoinfundibular em ratos. In: Anais da XLI Reunião Anual da SBNeC, 2018., Santos - SP. **Anais...** In: XLI REUNIÃO ANUAL DA SBNEC, 2018, SANTOS-SP. Santos - SP: 2018.
- AGUIAR, A. S. et al. Physical Exercise Improves Motor and Short-Term Social Memory Deficits in Reserpinized Rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452–457, ago. 2009.
- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 12, n. 10, p. 366–375, jan. 1989.
- ALVES, C. S. D. et al. Phosphatidylserine Reverses Reserpine-Induced Amnesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 404, n. 1–2, p. 161–167, set. 2000.
- ANDREWS, Z. B.; KOKAY, I. C.; GRATTAN, D. R. Dissociation of Prolactin Secretion from Tuberoinfundibular Dopamine Activity in Late Pregnant Rats*. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2719–2724, 1 jun. 2001.
- BASKIN, P.; SALAMONE, J. Vacuous Jaw Movements in Rats Induced by Acute Reserpine Administration: Interactions with Different Doses of Apomorphine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 46, n. 4, p. 793–797, dez. 1993.
- BEAL, M. F. Experimental Models of Parkinson's Disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 325–332, maio 2001.
- BEIGI, M. et al. Levodopa medication improves incidental sequence learning in Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, v. 93, p. 53–60, 2016.
- BENITO LEÓN, J. Epidemiología de la enfermedad de Parkinson en España y su contextualización mundial. **Revista de Neurología**, v. 66, n. 04, p. 125, 2018.
- BERRIOS, G. E. Introdução à “Paralisia agitante”, de James Parkinson (1817). **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 19, n. 1, p. 114–121, mar. 2016.
- BETARBET, R. et al. Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features of Parkinson's Disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, dez. 2000.
- BHATTACHARJEE, N. et al. Chronic exposure of homocysteine in mice contributes to dopamine loss by enhancing oxidative stress in nigrostriatum and produces behavioral phenotypes of Parkinson's disease. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 47–53, 2016.
- BISPO, J. M. M. et al. Sex Differences in the Progressive Model of Parkinsonism Induced by Reserpine in Rats. **Behavioural Brain Research**, v. 363, p. 23–29, maio 2019.

BORGHAMMER, P. How Does Parkinson's Disease Begin? Perspectives on Neuroanatomical Pathways, Prions, and Histology: Where Does Parkinson's Disease Begin? **Movement Disorders**, v. 33, n. 1, p. 48–57, jan. 2018.

BRAAK, H. et al. Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, mar. 2003.

BRECKENRIDGE, C. B. et al. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0151841, 7 abr. 2016.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. **3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists [16]***Nature*, 1957a. .

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, nov. 1957b.

CARVALHO, R. C. et al. Effects of Reserpine on the Plus-Maze Discriminative Avoidance Task: Dissociation between Memory and Motor Impairments. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p. 179–183, nov. 2006.

CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive Dopamine Neuron Loss in Parkinson's Disease: The Multiple Hit Hypothesis. **Cell Transplantation**, v. 15, n. 3, p. 239–250, mar. 2006.

CASAS, M. et al. Methylxanthines Reverse the Adipsic and Aphagic Syndrome Induced by Bilateral 6-Hydroxydopamine Lesions of the Nigrostriatal Pathway in Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 257–263, jun. 2000.

CENTONZE, D. et al. Unilateral Dopamine Denervation Blocks Corticostriatal LTP. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 6, p. 3575–3579, 1 dez. 1999.

CHEN, R. C. et al. Prevalence, Incidence, and Mortality of PD: A Door-to-Door Survey in Ilan County, Taiwan. **Neurology**, v. 57, n. 9, p. 1679–1686, 13 nov. 2001.

COVA, I. et al. Validation of the Italian version of the Non Motor Symptoms Scale for Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 2016.

D'SOUZA, T.; RAJKUMAR, A. P. Systematic Review of Genetic Variants Associated with Cognitive Impairment and Depressive Symptoms in Parkinson's Disease. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 32, n. 1, p. 10–22, fev. 2020.

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

ELBAZ, A. et al. Professional Exposure to Pesticides and Parkinson Disease: Professional Pesticide Exposure and PD. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 4, p. 494–504, out. 2009.

ELGUETA, D. et al. Pharmacologic antagonism of dopamine receptor D3 attenuates neurodegeneration and motor impairment in a mouse model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 110–123, 2017.

FAVERO, G. et al. Oral Supplementation of Melatonin Protects against Fibromyalgia-Related Skeletal Muscle Alterations in Reserpine-Induced Myalgia Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1389, 29 jun. 2017.

FERNANDES, V. S. et al. Memory Impairment Induced by Low Doses of Reserpine in Rats: Possible Relationship with Emotional Processing Deficits in Parkinson Disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1479–1483, ago. 2008.

FERNANDES, V. S. et al. Repeated Treatment with a Low Dose of Reserpine as a Progressive Model of Parkinson's Disease. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 154–163, maio 2012.

FERRO, M. M. et al. Comparison of Bilaterally 6-OHDA- and MPTP-Lesioned Rats as Models of the Early Phase of Parkinson's Disease: Histological, Neurochemical, Motor and Memory Alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 1, p. 78–87, out. 2005.

GOETZ, C. G. et al. Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: Status and Recommendations. **Movement Disorders**, v. 19, n. 9, p. 1020–1028, set. 2004.

GOETZ, C. G. et al. Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, Format, and Clinimetric Testing Plan. **Movement Disorders**, v. 22, n. 1, p. 41–47, jan. 2007.

GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a008862–a008862, 1 set. 2011.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GRANDI, L. C.; DI GIOVANNI, G.; GALATI, S. Animal Models of Early-Stage Parkinson's Disease and Acute Dopamine Deficiency to Study Compensatory Neurodegenerative Mechanisms. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 308, p. 205–218, out. 2018.

HEERINGA, M. J.; ABERCROMBIE, E. D. Biochemistry of Somatodendritic Dopamine Release in Substantia Nigra: An In Vivo Comparison with Striatal Dopamine Release. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, n. 1, p. 192–200, 1995.

HENRY, J. P. et al. Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. **Journal of Experimental Biology**, v. 196, p. 251–262, 1994.

HERNÁN, M. A. et al. A Meta-Analysis of Coffee Drinking, Cigarette Smoking, and the Risk of Parkinson's Disease: Coffee, Smoking, and PD. **Annals of Neurology**, v. 52, n. 3, p. 276–284, set. 2002.

HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 4, p. 292–300, 2016.

HOEHN, M. M.; YAHR, M. D. Parkinsonism: Onset, Progression, and Mortality. **Neurology**, v. 17, n. 5, p. 427–427, 1 maio 1967.

HORNYKIEWICZ, O. Dopamine Miracle: From Brain Homogenate to Dopamine Replacement. **Movement Disorders**, v. 17, n. 3, p. 501–508, maio 2002.

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

KLINE, N. S. USE OF RAUWOLFIA SERPENTINA BENTH. IN NEUROPSYCHIATRIC CONDITIONS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 59, n. 1, p. 107–132, abr. 1954.

KOO, H.-J.; LEE, H.-J.; IM, H. Sequence Determinants Regulating Fibrillation of Human α -Synuclein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 3, p. 772–778, abr. 2008.

KORDOWER, J. H. et al. Disease Duration and the Integrity of the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease. **Brain**, v. 136, n. 8, p. 2419–2431, ago. 2013.

KOULI, A. et al. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: JOHN VAN GEEST CENTRE FOR BRAIN REPAIR, DEPARTMENT OF CLINICAL NEUROSCIENCES, UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, UK et al. (Ed.). **Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects**. [s.l.] Codon Publications, 2018. p. 3–26.

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

LEAL, P. C. et al. Serotonergic Dysfunction in a Model of Parkinsonism Induced by Reserpine. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 96, p. 73–78, mar. 2019a.

LEAL, P. C. et al. Cognitive and Anxiety-like Impairments Accompanied by Serotonergic Ultrastructural and Immunohistochemical Alterations in Early Stages of Parkinsonism. **Brain Research Bulletin**, v. 146, p. 213–223, mar. 2019b.

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

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

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

LIDDLE, R. A. Parkinson's Disease from the Gut. **Brain Research**, v. 1693, p. 201–206, ago. 2018.

LINS, L. C. R. F. et al. Carvacrol Prevents Impairments in Motor and Neurochemical Parameters in a Model of Progressive Parkinsonism Induced by Reserpine. **Brain Research Bulletin**, v. 139, p. 9–15, maio 2018.

MA, S. Y. et al. Correlation between Neuromorphometry in the Substantia Nigra and Clinical Features in Parkinson's Disease Using Disector Counts. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 151, n. 1, p. 83–87, out. 1997.

MANDAL, A. **Parkinson's Disease History**. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/health/Parkinsons-Disease-History.aspx>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

MANYAM, B. V. Paralysis Agitans and Levodopa in ?Ayurveda?: Ancient Indian Medical Treatise. **Movement Disorders**, v. 5, n. 1, p. 47–48, 1990.

MARINO, B. L. B. et al. Parkinson's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 754–767, 2020.

MARTIN-JIMÉNEZ, C. A. et al. Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. **Molecular Neurobiology**, 28 out. 2016.

MELO, J. E. C. **Interferência da idade na progressão de parkinsonismo induzido por reserpina em ratos**. 2020. Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE, 2020.

NEISEWANDER, J. L.; LUCKI, I.; MCGONIGLE, P. Neurochemical Changes Associated with the Persistence of Spontaneous Oral Dyskinesia in Rats Following Chronic Reserpine Treatment. **Brain Research**, v. 558, n. 1, p. 27–35, ago. 1991.

OVALATH, S.; DEEPA, P. The History of Parkinsonism: Descriptions in Ancient Indian Medical Literature: History of Parkinsonism. **Movement Disorders**, v. 28, n. 5, p. 566–568, maio 2013.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, p. 14, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 7. ed. London: Elsevier Academic Press, 2017.

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

POLITIS, M. et al. Evidence of Dopamine Dysfunction in the Hypothalamus of Patients with Parkinson's Disease: An in Vivo 11C-Raclopride PET Study. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 1, p. 112–116, nov. 2008.

PRAKASH, K. et al. Neuroanatomical Changes in Parkinson's Disease in Relation to Cognition: An Update. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 7, n. 4, p. 123, 2016.

RITZ, B. et al. Pooled Analysis of Tobacco Use and Risk of Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 64, n. 7, p. 990, 1 jul. 2007.

RITZ, B. et al. Parkinson Disease and Smoking Revisited: Ease of Quitting Is an Early Sign of the Disease. **Neurology**, v. 83, n. 16, p. 1396–1402, 14 out. 2014.

SALAMONE, J. D. et al. Tremulous Jaw Movements in Rats: A Model of Parkinsonian Tremor. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 6, p. 591–611, dez. 1998.

SANBERG, P. R. et al. The Catalepsy Test: Its Ups and Downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748–759, 1988.

SANTOS, J. R. **Estudo das alterações cognitivas, motoras e neuroquímicas em dois novos modelos progressivos da doença de Parkinson**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2012.

SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 2013.

SCHULTZ, W. Dopamine Reward Prediction-Error Signalling: A Two-Component Response. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 183–195, mar. 2016.

SILVA, R. H. et al. Concomitant Development of Oral Dyskinesia and Memory Deficits in Reserpine-Treated Male and Female Mice. **Behavioural Brain Research**, v. 132, n. 2, p. 171–177, maio 2002.

SOUZA, M. F. et al. Intracerebroventricular Injection of Deltamethrin Increases Locomotion Activity and Causes Spatial Working Memory and Dopaminergic Pathway Impairment in Rats. **Brain Research Bulletin**, v. 154, p. 1–8, jan. 2020.

STANDAERT, D. G.; WALSH, R. R. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

STOKER, T. B.; GREENLAND, J. C. **Parkinson's disease: pathogenesis and clinical aspects**. [s.l: s.n.]

SUGAMA, S.; KAKINUMA, Y. Loss of Dopaminergic Neurons Occurs in the Ventral Tegmental Area and Hypothalamus of Rats Following Chronic Stress: Possible Pathogenetic Loci for Depression Involved in Parkinson's Disease. **Neuroscience Research**, v. 111, p. 48–55, out. 2016.

SULZER, D. Multiple Hit Hypotheses for Dopamine Neuron Loss in Parkinson's Disease. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 244–250, maio 2007.

SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. Parkinson's Disease Is Not Simply a Prion Disorder. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 41, p. 9799–9807, 11 out. 2017.

SVENSSON, E. et al. Vagotomy and Subsequent Risk of Parkinson's Disease: Vagotomy and Risk of PD. **Annals of Neurology**, v. 78, n. 4, p. 522–529, out. 2015.

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

VELÁZQUEZ-PANIAGUA, M. et al. Current treatments in Parkinson's including the proposal of an innovative dopamine microimplant. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 79, n. 2, p. 79–87, 2016.

VINGILL, S.; CONNOR-ROBSON, N.; WADE-MARTINS, R. Are Rodent Models of Parkinson's Disease Behaving as They Should? **Behavioural Brain Research**, v. 352, p. 133–141, out. 2018.

VOON, V.; FOX, S. H. Medication-Related Impulse Control and Repetitive Behaviors in Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 64, n. 8, p. 1089, 1 ago. 2007.

WELLS, J. A. et al. Functional MRI of the Reserpine-Induced Putative Rat Model of Fibromyalgia Reveals Discriminatory Patterns of Functional Augmentation to Acute Nociceptive Stimuli. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 38325, abr. 2017.

XIE, Z. et al. Comprehensive, Robust, and Sensitive UPLC-MS/MS Analysis of Free Biogenic Monoamines and Their Metabolites in Urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1099, p. 83–91, nov. 2018.

YOUNG, W. R. et al. Auditory Cueing in Parkinson's Patients with Freezing of Gait. What Matters Most: Action-Relevance or Cue-Continuity? **Neuropsychologia**, v. 87, p. 54–62, jul. 2016.