



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA



Efeito fase-dependente da reserpina na promoção de déficit comportamental e alteração neuroquímica na via nigro-estriatal de ratos

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Rovena Clara Galvão Januário Engelberth

Co-orientador: Dr. Felipe Porto Fiuza

Mestrando: Diego de Aquino Câmara

Natal-RN

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA



Efeito fase-dependente da reserpina na promoção de déficit comportamental e alteração neuroquímica na via nigro-estriatal de ratos

Dissertação apresentada à Universidade do Rio Grande do Norte, para obtenção do título de mestre em psicobiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Rovena Clara Galvão Januário Engelberth
Co-orientador: Dr. Felipe Porto Fiuza

Natal-RN
2020

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Câmara, Diego de Aquino.

Efeito fase-dependente da reserpina na promoção de déficit comportamental e alteração neuroquímica na via nigro-estriatal de ratos / Diego de Aquino Câmara. - Natal, 2020.
50 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rovena Clara Galvão Januário Engelberth.

Coorientador: Dr. Felipe Porto Fiuza.

1. Reserpina - Dissertação. 2. Estresse oxidativo - Dissertação. 3. Antioxidantes - Dissertação. 4. Ritmos circadianos - Dissertação. 5. Doença de parkinson - Dissertação.
I. Engelberth, Rovena Clara Galvão Januário. II. Fiuza, Felipe Porto. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 543.645.3

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer aos meu pais, Rosane Medeiros de Aquino Câmara e José Garcia Câmara Júnior, por sempre acreditarem e me apoiarem a seguir me especializando através dos estudos, a minha irmã Camilla de Aquino e a toda a minha família.

A minha orientadora Rovena Clara Galvão Januário Engelberth que me abriu as portas do laboratório de estudos neuroquímicos e sempre esteve disponível para tirar dúvidas, guiar e ajudar como fosse possível para que tudo neste trabalho saísse da melhor forma possível.

Ao Lenq e a todos os cidadãos Lenquianos, que já passaram ou que ainda estão por aqui, como André Pontes, Ramon hypolito, Priscila Tavares, Ywilliane Meurer, Aline Dierschnabel, Ezequiel Nascimento, Cinthya Montenegro, Kayo Diógenes, Carlos Queiroz, Marília Cruz, Thiago Brasil, Lara Porpino, Sophia Guedes, Mateus Silva, Eryck Holmes, Nelyane Nayara, Lady Clarissa, Lyzandro Lucas, Sâmara França entre outros que sempre participaram da minha formação desde os tempos de iniciação científica e faziam até os momentos mais monótonos da ciência se tornarem marcantes. Também não posso esquecer de Luiz Eduardo, Diana Aline e Felipe Fiuza que também estiveram diretamente ligados a este trabalho, sempre disponíveis para ajudar nos experimentos e sanando pacientemente diversas dúvidas, principalmente o Fiuza que além de tudo foi meu coorientador.

Agradecer a pós-graduação de psicobiologia a qual muito me ensinou através dos excelentes profissionais que a compõe de professores, secretárias até ao pessoal da limpeza que sempre facilitam a nossa vida, agradecer também a instituição UFRN que proporciona toda a infraestrutura para a realização da pesquisa, como bibliotecas, laboratórios, segurança e etc..... Sem esquecer dos órgãos de fomento Capes e CNPq que nos financiam e sem eles o trabalho científico seria muito mais difícil.

Por fim agradecer a banca examinadora deste trabalho, composta pelo professor Jeferson de Souza Cavalcante e o professor José Rodolfo Cavalcanti que se dispuseram a avaliar este trabalho, em um prazo apertado, cedendo parte do seu precioso tempo para a melhoria deste trabalho científico.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos da produção de ERO pela cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias
página 12
- Figura 2.** Maquinaria molecular do relógio circadiano composta por alças de retroalimentação, reguladas pelas proteínas BMAL1, PER, CRY e CLOCK.
Página 15
- Figura 3.** Componentes relacionados com a regulação do estresse oxidativo demonstram padrão oscilatório em seus picos de atividade.
Página 16
- Figura 4.** Representação esquemática dos eventos moleculares nos neurônios dopaminérgicos (esquerda), noradrenérgicos (centro) e serotoninérgicos (direita) depois da administração das principais toxinas (MPTP, 6-OHDA, Pesticida, Reserpina) usada para induzir modelos animais da DP.
Página 18
- Figura 5.** Desenho experimental da pesquisa
Página 24
- Figura 6.** Aparato experimental para o registro dos ritmos de atividade e repouso, através de sensores
Página 24
- Figura 7.** Aparato experimental para o teste de Catalepsia.
Página 25
- Figura 8.** Actograma duplo para o registro de atividade dos animais dos grupos: A) CTR ZT6, B) RES ZT6, C) CTR ZT18, D) RES ZT 18.
Página 29
- Figura 9.** Periodogramas dos grupos (A) CTR ZT6, (B) CTR ZT18, (C) RES ZT6 e (D) RES ZT18. Linha pontilhada horizontal representa 30%V, valor no qual consideramos o limite inferior da robustez do ritmo. Linha vertical equivale ao período de 1440 min (24h).
Página 30
- Figura 10.** Efeito (Média \pm D.P) do tratamento utilizando reserpina 0,1 mg/kg (grupo RES ZT6 – n=11 e grupo RES ZT 18 – n=12) ou controle (CTR ZT6 – n=8 e CTR ZT18 – n =10) no teste de catalepsia. No eixo X, os dias de tratamento indicam a aplicação de reserpina ou veículo. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA de 2 vias para múltiplas comparações, seguida por post hoc com teste de tukey. *p<0,05 com relação a RES ZT6x RES Z18; #p<0,05 com relação ao grupo controle de mesmo ZT (RES ZT6 x CTR ZT6 e RES ZT18 x CTR ZT18).
Página 31
- Figura 11.** Análise imunoistoquímica de células TH+ nas regiões do VTA, SNpc e SNL dos grupos CTR e RES em diferentes ZTs de aplicação da reserpina (ZT6 e ZT18). As células de TH+ da (A) área tegmentar ventral, (B) Substância negra parte compacta e (C) Substância negra lateral foram plotadas como média \pm S.E.M.
Página 32
- Figura 12.** Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encefálo do rato, mostrando a imunoistoquímica para células TH+ nas regiões da substância negra parte compacta (SNpc) em azul e lateral (SNL) em preto. A) Grupo CTR ZT6, B) Grupo RES ZT6, C) Grupo CTR ZT18, D) Grupo RES ZT18.
Página 33
- Figura 13.** Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encefálo do rato, mostrando a imunoistoquímica para células TH + na região tegmentar ventral (VTA). A) Grupo CTR ZT6, B) Grupo RES ZT6, C) Grupo CTR ZT18, D) Grupo RES ZT18.
Página 34

Figura 14. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encéfalo do rato, mostrando a imunistoquímica para células TH + na região do SNpc (azul) e SNL (preto). A) CTR ZT6, B) RES ZT6, C) CTR ZT18, D) RES ZT18. Página 35

Figura 15. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encéfalo do rato, mostrando a imunistoquímica para células TH + na região tegmentar ventral (VTA). A) CTR ZT6, B) RES ZT6, C) CTR ZT18, D) RES ZT18. Página 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagem de células TH+ dos grupos submetidos ao protocolo de reserpina. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Página 33

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AS	Proteína Alfa-sinucleína
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like 1
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
CRY	Flavoproteínas criptocromo
CTR	Grupo controle
DAT	Transportador de dopamina
DP	Doença de Parkinson
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GST	Glutathione transferase
H2O2	Peróxido de hidrogênio
Lenq	Laboratório de estudos neuroquímicos
MPP+	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OH	Hidroxila
PER	Proteínas período
RES	Grupo reserpina
RL	Radicais livre
s.c	Subcutânea
SNL	Substância negra lateral
SNpc	Substância negra pars compacta
SOD	Superóxido dismutase
STC	Sistema de temporização circadiana
TH	Tirosina-hidroxilase
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
VTA	Área tegmentar ventral
ZTs	Zeitgeber time

RESUMO

A reserpina induz a falha na capacidade de armazenamento das monoaminas nas vesículas sinápticas, gerando uma depleção dessas substâncias no nervo terminal e aumento do estresse oxidativo (EO). Um grande corpo de evidências mostra que este fármaco causa o aparecimento de sintomas motores e não motores semelhantes aos vistos na doença de Parkinson, sendo seu protocolo de aplicação comumente executado durante a fase de claro, usando animais noturnos como principal modelo experimental. Alguns estudos, no entanto, sugerem que na fase de claro existe uma menor concentração de antioxidantes no organismo desses animais noturnos devido a oscilações diárias na produção de enzimas como a catalase e superóxido dismutase, além do neurohormônio melatonina, que apresentam picos durante a fase de escuro. Essas oscilações, portanto, podem representar uma vulnerabilidade dependente de fase a desordens decorrentes de danos a estrutura do DNA, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas. Muitos desses parâmetros de ritmicidade biológica não são levadas em conta no momento de padronização de modelos experimentais o que pode distanciar os resultados obtidos nesses animais da fisiopatologia de algumas desordens. Tendo em vista as interações da maquinaria circadiana e o EO, o objetivo deste trabalho é observar se o modelo farmacológico da reserpina em ratos (Santos et al., 2013), quando aplicado durante a fase de escuro, apresenta o mesmo efeito de indução dos sintomas motores da DP comparado com seu protocolo padrão de aplicação na fase de claro, bem como se ocorre alterações neuroquímicas na via nigro-estriatal. Foram utilizados 41 animais com idade aproximada de 3 meses. Os animais foram submetidos à administração da reserpina em duas fases distintas, atividade e repouso; o efeito da droga no comportamento foi avaliado através do teste de catalepsia. Os animais também tiveram uma avaliação, em grupo, do ritmo de atividade-repouso durante todo o procedimento experimental. Posteriormente, foram avaliados parâmetros neuroquímicos relacionados quantificação dos neurônios dopaminérgicos. A administração de reserpina não apresentou alterações significativas no período de atividade/repouso dos grupos. No teste de catalepsia observamos que os animais tratados com a droga apresentaram a perda motora esperada ao final do protocolo, no entanto o grupo que recebeu o tratamento com reserpina durante a noite teve o início dessa perda motora de maneira mais tardia, em relação ao grupo que recebeu o tratamento durante o dia. Já na avaliação neuroquímica, não foi vista uma perda neuronal significativa na substância negra parte compacta e substância negra lateral, apenas a área tegmentar ventral mostrou uma perda neuronal significativa no grupo que recebeu a reserpina durante a noite em relação ao seu grupo controle.

Palavras chave: Reserpina, Estresse oxidativo, Antioxidantes, Ritmos circadianos, Doença de Parkinson

ABSTRACT

Reserpine induces a failure in the storage capacity of monoamines in synaptic vesicles, generating a depletion of these substances in the terminal nerve and an increase in oxidative stress. A large body of evidence shows that this drug causes the appearance of motor and non-motor symptoms similar to those seen in Parkinson's disease, with its common application protocol resulting from a light phase, using nocturnal animals as the main experimental model. Some studies, however, realization that in the light phase there is a lower concentration of antioxidants in the animal body, nocturnal animals due to daily fluctuations in the production of enzymes such as catalase and superoxide dismutase, in addition to the neurohormone melatonin, which show peaks during the dark. These oscillations, therefore, can represent a phase-dependent vulnerability to disorders resulting from damage to a DNA structure, lipid peroxidation and protein oxidation. Many parameters of biological rhythmicity are not taken into account when standardizing experimental models, which can distance the animal results from the pathophysiology of some disorders. In view of the interactions of circadian machinery and EO, the objective of this work is to observe whether the pharmacological model of reserpine in rats (Santos et al., 2013), when provided during a dark phase, has the same effect of inducing symptoms DP engines compared to their standard application protocol in the clear phase, as well as neurochemical changes in the nigrostriatal pathway. 41 animals were used with an approximate age of 3 months. The animals were prepared for the administration of reserpine in two distinct phases, activity and rest; the effect of the drug on behavior was assessed using the catalepsy test. The animals also have a group assessment of the rest-rest rhythm throughout the experimental procedure. Subsequently, neurochemical parameters related to the quantification of dopaminergic neurons were adopted. The administration of reserpine does not change changes in the activity / rest period of the groups. In catalepsy test we observed that animals treated with the drug had the expected motor loss at the end of the protocol, however the group that has received the treatment with reserpine during the night had the beginning of this motor loss later, in relation to the group that has received the treatment during the day. In the neurochemical evaluation, it was not seen a neuronal loss consolidating in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and substantia nigra lateral (SNL), only a ventral tegmental area (VTA) revealed a meaning neuronal loss in the group that includes a reserpine during the night in relation to its control group.

Keywords: Reserpine, Oxidative stress, Antioxidants, Circadian rhythms, Parkinson's disease

SUMÁRIO

RESUMO

1. Introdução	11
1.1. O estresse oxidativo	11
1.2. Ritmicidade circadiana e a regulação dos mecanismos antioxidantes	13
1.3. Modelos da doença de Parkinson baseados em estresse oxidativo	16
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Hipóteses	22
5. Metodologia	23
5.1. Animais	23
5.2 Design experimental	23
5.3 Procedimentos experimentais	24
5.3.1 Registro da atividade locomotora	24
5.3.2 Teste de catalepsia	25
5.3.3 Perfusão e microtomia	25
5.3.4 Imunoistoquímica	26
5.4 Análise estatística	26
6. Resultados	28
6.1 Registro de atividade e repouso	28
6.2 Comportamento de catalepsia	30
6.3 Imunoistoquímica	31
7. Discussão	37
8. Conclusões	40

9. Considerações finais	41
10. Referências	42
11. Anexos	47

1. Introdução

1.1- O estresse oxidativo

Os processos de oxidação-redução estão presentes em mecanismos bioenergéticos, anabólicos e catabólicos sendo, portanto, fundamentais para a vida (Sies, Berndt, & Jones, 2017). O conceito de estresse oxidativo (EO) foi primeiro formulado em 1985 como sendo “um distúrbio entre o balanço pró-oxidante e antioxidante, em favor do primeiro” (Sies, Cadenas, Symons, & Scott, 1985). Atualmente, o entendimento de que contrabalancear a produção de radicais livres (RL), principal subproduto metabólico pró-oxidante, pode aumentar a expectativa de vida e atenuar doenças cardiovasculares ou neurodegenerativas, tem aumentado o interesse de cientistas de diversas áreas da saúde sobre esse tema (Chen & Zweier, 2014).

Os RL são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados na sua camada de valência. Dessa forma, existe uma tendência desses elétrons atraírem outros elétrons livres ou de macromoléculas, como proteínas, lipídios ou DNA, para se estabilizar ao passo que as desestabiliza (Slater, 1984). Os principais tipos de RL são as espécies reativas de oxigênio (ERO) oriundas de reações catalisadas por enzimas, como a respiração aeróbica, ou de resposta a exposição de agentes estressores exógenos. As ERO englobam uma variada classe de compostos, tais como oxigênio singlet, radical superóxido, hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), perhidroxil, alcóxil, peróxil, hidroperóxido orgânico e carbonila excitada (Helmut Sies, 1991).

Apesar de serem produzidos no citosol e em qualquer outra organela, a maior fonte geradora de ERO ocorre na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias, em especial no complexo I (NADH - desidrogenase) e complexo III (Ubiquinona, citocromo C – redutase) (Murphy, 2009). Nessa cadeia, o NADH atua como doador de elétrons ao se oxidar em NAD⁺ através da ação das enzimas do complexo I, liberando H⁺ para o espaço inter-membrana enquanto esses elétrons livres se destinam ao complexo III e eventualmente ao complexo IV, onde ocorre a redução das moléculas de oxigênio em água, para posteriormente ser gerado ATP no complexo ATP-sintase (Liu et al., 2002). Em condições de baixa produção de ATP ou aumento exacerbado na razão NADH/NAD⁺, os elétrons doados pelo NADH nos complexos I e III extravasam para a matriz mitocondrial e reduzem moléculas de oxigênio, formando o radical superóxido o qual é associado a cascatas metabólicas que desencadeiam a formação dos outros ERO (Fig.1) (Fanjul-Moles & López-Riquelme, 2016; Murphy, 2009)

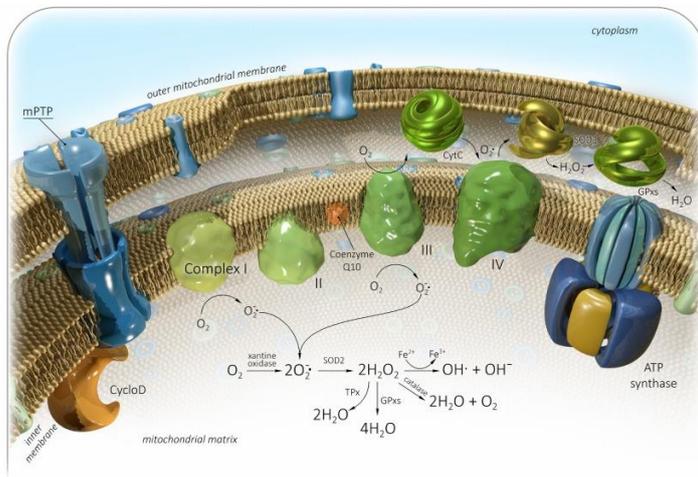


Figura 1. Mecanismos da produção de ERO pela cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias (Kudryavtseva et al., 2016).

É relevante observar que o aumento do EO é uma característica comum ao envelhecimento e quadros patológicos como doenças neurodegenerativas. De fato, as primeiras teorias modernas sobre o envelhecimento biológico são embasadas na suposição lógica de que quanto mais tempo de metabolismo um organismo é submetido, mais RL serão gerados e maior a probabilidade de EO, significando danos celulares a longo prazo (Harman, 1956). Atualmente, a relação entre EO e envelhecimento não é mais simplesmente caracterizada como “fonte de dano acumulado com o tempo”, uma vez que sabe-se que a produção de RL, como H₂O₂, tem importante função na sinalização de vias intracelulares (Pérez et al., 2009). Ainda, a hipótese mitohormética postula que estressores crônicos de baixa intensidade, apesar de induzirem a produção de RL, a longo prazo favorecem a proteção contra estressores de maior intensidade (Masoro, 2007). A exemplo disso, protocolos de restrição calórica podem triplicar a expectativa de vida de nematódeos e aumentar em até 50% a de roedores a despeito de seu aumento pró-oxidativo (Fontana et al., 2010; Guo et al., 2018). Embora o EO não seja mais considerado o único protagonista no processo de envelhecimento, não se nega a interdependência entre esses dois processos uma vez que o EO induz a perda de proteostase, disfunções mitocondriais, instabilidade genômica e senescência celular, sintomas chave do envelhecimento (López-Otín et al., 2013).

O dano oxidativo gerado pela produção das ERO é inibido ou atenuado por substâncias antioxidantes que podem ser tanto exógenas como endógenas e enzimáticas ou não enzimáticas

(Birben et al., 2012). Os sistemas enzimáticos de proteção antioxidante consistem de moléculas intracelulares, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase, transferase (GST) ou redutase. Essas enzimas têm vias comuns de remoção das ERO. Por exemplo, a SOD atua na conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, RL mais estável e menos danoso, e este por sua vez pode ser eliminado pela via da glutatona peroxidase que o converte em água (Rahman, 2007).

Em comparação, os antioxidantes não enzimáticos em sua maioria são exógenos e podem ser divididos em vitaminas lipossolúveis (vitamina A vitamina E ou beta caroteno), hidrossolúveis (vitamina C e vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio e magnésio) (Fanjul-Moles & López-Riquelme, 2016). A vitamina C é considerada o principal sistema antioxidante hidrossolúvel. Ela atua de forma generalizada na remoção de RL e oxigênio singlet, além de regenerar a vitamina E, ou tocoferol, que é um dos principais sistemas antioxidantes lipossolúveis das membranas celulares, juntamente com os carotenoides (Fanjul-Moles & López-Riquelme, 2016; Rahman, 2007). Outro antioxidante não enzimático importante é a melatonina, neuro-hormônio secretado pela glândula pineal de vertebrados (Reiter, 1991). Ela participa na transdução de sinal intracelular, padronização da proliferação de morte celular, sequestrando e inibindo a geração de RL, bem como estimulando a síntese de outros antioxidantes endógenos, como a SOD, glutatona e glutatona peroxidase ou redutase. Além disso, balanceia o funcionamento do complexo I mitocondrial impedindo a formação de ERO oriundos das disfunções da cadeia respiratória (Sun et al., 2015).

1.2- Ritmicidade circadiana e a regulação dos mecanismos antioxidantes

A evolução da maioria ou senão de todos os organismos vivos na terra foi moldada por um ciclo claro/escuro que apresenta um período em torno de 24h. Sendo assim, padrões rítmicos de sinalização celular, cascatas bioquímicas, expressão gênica, atividade fisiológica e comportamental conferem ao organismo vantagem adaptativa ao prover respostas antecipatórias a flutuações ambientais diárias. Esses padrões conhecidos como ritmos circadianos são regulados endogenamente e estão presentes desde cianobactérias até os eucariotos (Dibner et al., 2010).

A variação da intensidade luminosa é a principal pista externa (zeitgeber) que atua como agente sincronizador dos ritmos circadianos de boa parte dos seres vivos (Wilking et al., 2013). Essa variação fótica é captada por um complexo sistema de regiões neurais interligadas, o sistema de temporização circadiana (STC) (Cavalcante et al., 2006). Classicamente, o STC é composto por três principais componentes: vias de entrada da informação sensorial, um marca-passo central e vias de saída conectadas com efetores comportamentais (Morin, 2013). Em mamíferos, o marca passo central é o

núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado no hipotálamo, cuja via de entrada fótica é fornecida diretamente pela retina através do trato retino-hipotalâmico (Hendrickson et al., 1972; Moore & Lenn, 1972; Welsh et al., 2010). O NSQ por si só é capaz de gerar e modular os ritmos circadianos, porém sua função é ajustada pelas aferências modulatórias provenientes do folheto intergeniculado do tálamo e dos núcleos serotoninérgicos da rafe, majoritariamente relacionados a estímulos não fóticos como alerta e novidade ambiental (Hay-Schmidt et al., 2003; Moore & Card, 1994).

O NSQ tem três principais vias de saída: uma que tem terminação no septum, outra que chega ao núcleo paraventricular do tálamo e a maior e mais robusta que inerva as porções periventricular, retroquiasmática e subparaventricular do hipotálamo (Morin, 2013). Parte dessas projeções mais robustas terminam no núcleo paraventricular do hipotálamo, de onde se projetam neurônios para a coluna intermédia lateral da medula espinhal, fazendo sinapse com neurônios do gânglio cervical superior, que por sua vez se projeta para a glândula pineal, fornecendo o controle circadiano da secreção de melatonina, cujo pico ocorre durante a fase de escuro (Moore, 1995; Reiter et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos na ritmicidade circadiana englobam oscilações de expressão de genes relógio através de alças de retroalimentação transcricionais-traducionais (Fig.2) (Ko & Takahashi, 2006). Proteínas que regulam positivamente a transcrição incluem, Brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1) e circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) enquanto os que inibem incluem as flavoproteínas criptocromo (CRY) e as proteínas período (PER). De modo geral, BMAL1 e CLOCK se ligam às regiões promotoras do DNA dos genes relógios, interagindo com a sua cromatina e favorecendo sua expressão. No entanto, essa ação também favorece a transcrição dos genes *cry* e *per* acarretando em aumento da expressão das proteínas CRY e PER que por sua vez irão causar a inibição do complexo BMAL1 e CLOCK, retroalimentando negativamente o circuito (Shearman, 2000). Expressões rítmicas de BMAL1, CLOCK, CRY e PER estão presentes em células de praticamente todos os tecidos (Koike et al., 2012).

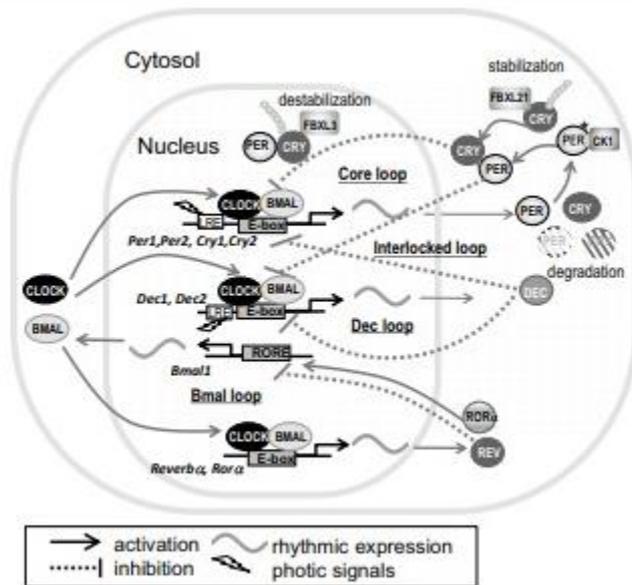


Figura 2. Maquinaria molecular do relógio circadiano composta por alças de retroalimentação, reguladas pelas proteínas BMAL1, PER, CRY e CLOCK. (Honma, 2018).

Vários componentes moleculares comuns aos processos de EO e ritmicidade circadiana já foram identificados (Hood & Amir, 2017). Já foi mostrado, por exemplo, que a deleção do gene *Bmal 1* em camundongos acarreta na diminuição da expressão do fator de transcrição Nrf2 que tem conhecida ação de promover a produção de enzimas antioxidantes, levando a um maior acúmulo de ERO (Lee et al., 2013; Zhao et al., 2017). Adicionalmente, em outro estudo utilizando camundongos nocaute para *Bmal 1*, foi mostrado que esses animais apresentavam um prematuro fenótipo de envelhecimento, contendo uma acelerada perda da massa óssea e muscular, catarata e redução de expectativa de vida, fatores associados a falha na atividade antioxidante e acúmulo de ERO, sendo eles parcialmente recuperados com a administração do antioxidante N-acetil L cisteína (Kondratov, 2006; Kondratov et al., 2009). Ademais, a proteína SIRT1 promove a desacetilação das proteínas BMAL1 e PER2 com o auxílio do NAD⁺ como co-fator. Dessa forma, essa proteína regula a razão NADH/NAD⁺ favorecendo o funcionamento normal da cadeia transportadora de elétrons e, simultaneamente, favorece a ação de BMAL1 em conjunto com a inibição de PER2-CRY impedindo a retroalimentação negativa do relógio molecular (Yang et al., 2017).

Já foi demonstrado que a expressão de algumas enzimas antioxidantes, como por exemplo a catalase, SOD e GST tem expressão circadiana (Fig.3) (Krishnan et al., 2008). Já foi relatado, em rins

e fígado de camundongos, que a catalase apresenta flutuação diária de atividade, tendo um pico no meio da fase escura (Patel et al., 2014). Em hamster, também foi demonstrado que ocorre um maior nível de produção e atividade de SOD durante a fase de escuro (Tomas-Zapico et al., 2003). A enzima GST em roedores, apresenta um padrão mais polifásico de expressão, com picos de atividade tanto durante a fase de escuro, quanto durante a fase clara (Musiek & FitzGerald, 2013). Essas variações nos picos de atividade de enzimas antioxidantes mostram que possivelmente há vulnerabilidade dependente de fase a injúrias/ desordens decorrentes de danos a estrutura do DNA, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas (Wilking et al., 2013).

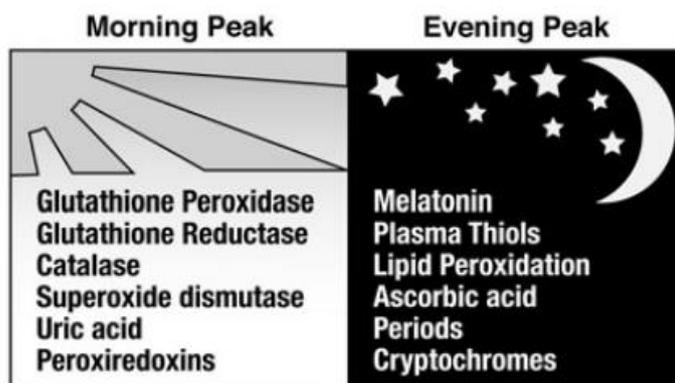


Figura 3. Componentes relacionados com a regulação do estresse oxidativo demonstram padrão oscilatório em seus picos de atividade. Retirado de (Wilking et al., 2013).

1.3- Modelos da doença de Parkinson baseados em estresse oxidativo.

O sistema nervoso é particularmente vulnerável aos danos do EO uma vez que os neurônios possuem altas taxas metabólicas, grande quantidade de ácidos graxos peroxidáveis e metais de transição, baixa concentração de antioxidantes e baixa capacidade de regeneração (Franco-Iborra et al., 2018). Isso é refletido, por exemplo, na patogenia da doença de Parkinson (DP), onde é visto que os neurônios dopaminérgicos do circuito nigroestriatal em cérebros de pacientes com DP apresentam uma maior concentração de ferro, metal que intensifica a formação de ERO, quando comparados a pacientes controle (Sian-Hülsmann et al., 2011).

A história da doença de Parkinson (DP) se inicia oficialmente em 1817 quando James Parkinson, um médico inglês, inspirado pela observação de várias pessoas que apresentavam sintomas

semelhantes nas ruas de Londres, publica uma dissertação intitulada “The Shaking Palsy”, onde é caracterizada uma nova doença que apresentava um início insidioso e uma incapacitação progressiva (Marsili et al., 2018; Obeso et al., 2017). Mesmo após 200 anos de sua descrição, a DP continua sendo amplamente estudada e é a segunda condição neurodegenerativa mais frequente, após a doença de Alzheimer (Elbaz et al., 2016). Todo ano 13 em cada 100.000 mil pessoas são diagnosticadas com DP, com uma maior prevalência na população idosa onde 2-3% das pessoas acima dos 65 anos são afetadas (Williams-Gray & Worth, 2016). Com o aumento da expectativa de vida mundial a DP está cada vez mais frequente e é esperado que o seu número de diagnósticos seja dobrado até 2040. Isso poderá causar um aumento nos encargos sociais e econômicos (Leal et al., 2016).

A DP é caracterizada clinicamente pela presença de sintomas motores como tremores, lentidão dos movimentos, rigidez e instabilidade postural e por uma fase prodromal com a presença de sintomas não motores como a constipação, anosmia (perda olfativa), depressão, psicose, disfunção cognitiva, demência e alterações no ritmo de sono – vigília e distúrbios de sono (*e.g.* síndrome das pernas inquietas, distúrbio comportamental do sono REM e sonolência diurna excessiva). Esses sintomas não motores podem tanto preceder quanto se desenvolverem em paralelo com os sintomas motores (Elbaz et al., 2016; Williams-Gray & Worth, 2016). A mais conhecida característica da DP está nos sintomas motores da doença, que são decorrentes de uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos imunomarcados por tirosina-hidroxilase (TH) na substância negra, acarretando em uma redução do aporte de dopamina para o estriado dorsal. Por outro lado, os sintomas não motores estão atrelados ao processo neurodegenerativo de outras regiões dopaminérgicas, assim como também de outros sistemas de neurotransmissão como os circuitos noradrenérgicos que partem do locus ceruleus e os serotoninérgicos dos núcleos da rafe no tronco encefálico (Leal et al., 2016). Além disso, outros mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos no início e na progressão da DP, bem como disfunções mitocondriais, distúrbios nas vias de liberação de proteínas, agregação anormal da proteína alfa-sinucleína (AS) formando corpúsculos de Lewi e estresse oxidativo (Elbaz et al., 2016; Maiti et al., 2017).

Uma metodologia bastante utilizada para se discutir essas hipóteses são os modelos animais. Tais modelos consistem na administração de fármacos ou no uso de animais transgênicos, que induzem alterações neuroquímicas e comportamentais similares as observadas na DP (Jagmag et al., 2016). Os fármacos mais utilizados para este fim são a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), rotenona, paraquat e reserpina. Essas drogas atingem o sistema dopaminérgico por diferentes vias (Fig.4). A toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é convertida pela micróglia a 1-metil-4-fenilpidina (MPP⁺), que é retomado pelo transportador de dopamina (DAT) pelos neurônios dopaminérgicos. Uma vez dentro dos neurônios, MPP⁺ age inibindo o complexo-I da cadeia respiratória. Já pesticidas (Rotenona e Paraquat) também

são capturados por DAT e têm ação direta no complexo-I da cadeia respiratória. A 6-hidróxidopamina (6-OHDA), por sua vez, é uma neurotoxina que age igualmente nos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, entrando nos neurônios via DAT e pelos transportadores noradrenérgicos (NAT), respectivamente (Leal et al., 2016).

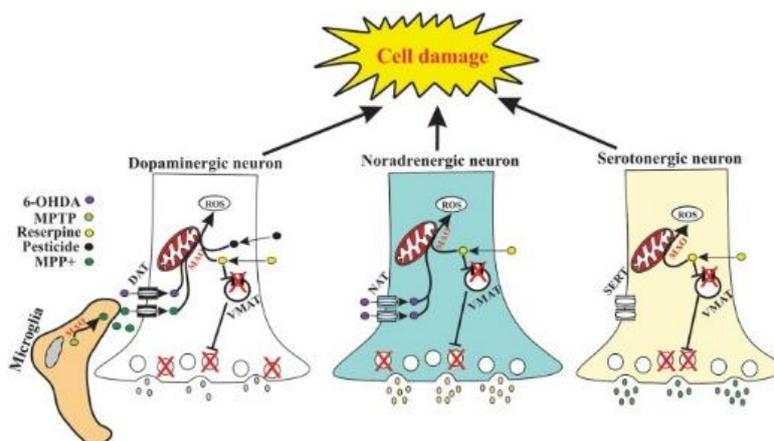


Figura 4. Representação esquemática dos eventos moleculares nos neurônios dopaminérgicos (esquerda), noradrenérgicos (centro) e serotoninérgicos (direita) depois da administração das principais toxinas (MPTP, 6-OHDA, Pesticida, Reserpina) usada para induzir modelos animais da DP. Retirado de (Leal et al., 2016).

A reserpina é um dos modelos animais mais antigos utilizados nas pesquisas da DP, sendo um alcalóide extraído das raízes da *Rauwolfia serpentina* (Leal et al., 2016). A princípio foi utilizada no tratamento para a hipertensão, por diminuir a pressão sanguínea, e para acalmar pacientes com ansiedade. Após alguns anos, entretanto, foi observado que uma alta porcentagem dos pacientes que receberam esse tratamento desenvolveram parkinsonismo (Fahn, 2015). Esse fármaco atua diminuindo a capacidade de armazenamento e concentração de monoaminas, como noradrenalina, serotonina (5-HT) e dopamina no cérebro e em órgãos periféricos através da inibição do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) no sistema nervoso central (Duty & Jenner, 2011; Leão et al., 2015), afetando diferentes vias dopaminérgicas, como a via nigroestriatal e a mesolímbica, onde a primeira está envolvida com o aparecimento dos sintomas motores e o segundo está mais relacionado com os sintomas não motores (Klein et al., 2019). Especificamente, a reserpina induz uma perda na capacidade de estocagem das monoaminas nas vesículas sinápticas, depleção de monoaminas no nervo terminal e um anormal acúmulo citosólico de monoaminas nos neurônios pré-sinápticos, aumentando o EO intracelular (Leal et al., 2016).

Em comparação com outros modelos, que causam déficits motores irreversíveis após uma única administração, a reserpina produz uma gradual progressão do parkinsonismo em roedores quando administrada continuamente e em pequenas doses (0,1 mg/kg), originando alterações motoras severas precedidas de alterações cognitivas (Luo et al., 2017; Santos et al., 2013). Alterações não motoras também podem ser observadas na administração de uma única dose (1.0 – 5.0 mg/kg), causando déficits de memória e comportamentos do tipo ansioso sem o aparecimento dos danos motores (Fernandes et al., 2012). Atualmente alguns estudos têm seguido o protocolo de administração da reserpina na fase de descanso dos roedores (08:00 am – 04:00 pm) (Brandão et al., 2017; Fernandes et al., 2012; Leão et al., 2017; Massari et al., 2017; Santos et al., 2013). Em adição, estudos com *Drosophila melanogaster* mostram que existem diferenças de taxa de mortalidade referentes ao horário de exposição a agentes promotores de EO (Krishnan et al., 2008). Tendo em vista as intersecções entre a maquinaria circadiana e o EO, no presente trabalho buscamos observar se o efeito da reserpina quando aplicado durante a noite, fase de atividade do animal, induz os sintomas da DP quando em comparação ao protocolo padrão de aplicação na fase de repouso (Santos et al., 2013).

2. Justificativa

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de investigação em colaboração com outros grupos, atuou na padronização de modelos farmacológicos para otimização do seu potencial em mimetizar doenças neurodegenerativas. Os modelos baseados em indução de um desequilíbrio oxidativo ou depleção de dopamina por meio de neurotoxinas são as estratégias mais utilizadas para o estudo da DP uma vez que modelos genéticos apresentam as desvantagens de não reproduzirem com fidelidade sintomas fisiopatológicos chave e representarem apenas de 5-10% dos casos da DP. Em paralelo, temos expertise no estudo de ritmos biológicos e sistema de temporização circadiana, variável muitas vezes pouco explorada no estabelecimento de tais modelos e que por vezes trazem discussões referentes a fidedignidade dos resultados e sua extrapolação para o que ocorre em humanos. Considerando que o modelo de reserpina atua por vias favorecedoras do EO, sendo estas intimamente associadas aos mecanismos de ritmicidade biológica, destacamos que a proposta de estudar variações fase-dependentes induzidas por reserpina fornece um panorama mais completo do entendimento desse modelo e suas aplicações, além de possibilitar a expansão do conhecimento básico sobre EO, DP e ritmicidade circadiana.

3 – Objetivos

3.1- Geral

Avaliar os efeitos da aplicação de reserpina levando em consideração duas fases distintas, atividade e repouso dos animais.

3.2- Específicos

- Avaliar o ritmo de atividade repouso dos animais durante todo o protocolo experimental;
- Avaliar a progressão dos déficits motores característicos do protocolo reserpina quando comparado aplicações do fármaco em duas diferentes fases do animal, atividade e repouso;
- Avaliar se existem alterações na quantidade de neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal comparando as diferentes fases de aplicação do protocolo reserpina, bem como em dois diferentes horários de sacrifício (ZT6 e ZT18).

4. Hipóteses

- H0: A reserpina, quando aplicada no horário de atividade do animal altera as variações circadianas na expressão de proteínas e hormônios, alterando a resposta celular ao EO, podem afetar a eficácia da droga de acordo com o horário de aplicação.
- H1: A reserpina, quando aplicada no horário de atividade do animal não altera as variações circadianas na expressão de proteínas e hormônios, alterando a resposta celular ao EO, podem afetar a eficácia da droga de acordo com o horário de aplicação.

5. Metodologia

5.1 - Animais

Foram utilizados um total de 41 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos com 3 meses de idade. Todos os animais foram abrigados no biotério de experimentação do laboratório de estudos neuroquímicos (Lenq), em grupos de 4 por caixa (32cm x 39cm x 16,5cm) com acesso a água e comida a vontade, condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) e de fluxo de ar e sob ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes acendem as 6:30h AM). Todos os experimentos aqui executados foram autorizados pelo comitê de ética em uso animal, sob o número de protocolo 008/2019, certificado nº 155.008/2019 (em anexo) seguindo os direcionamentos exigidos pelo órgão fiscalizador (Concea).

5.2 - Design experimental

Os animais passaram por um período de manipulação para uma melhor habituação ao experimentador, onde foram manuseados diariamente por 10 min durante 5 dias antes do começo do experimento. Logo após esse manuseio, os ratos foram aleatoriamente direcionados para um dos 4 grupos: Controle (ZT6) (CTR/ZT6: n=8), Reserpina (ZT6) (RES/ZT6: n=11), Controle (ZT18) (CTR/ZT18: n=10) e Reserpina (ZT18) (RES/ZT18: n=12). Todos os animais passaram por um registro de atividade basal de 14 dias, com sensores de movimento, e permaneceu durante todo o protocolo de administração da reserpina. Os animais do grupo CTR (ZT6) e CTR (ZT18) foram administrados com solução salina subcutâneas (s.c) em seus respectivos ZT's e em dias alternados. Os do grupo RES (ZT6) e RES (ZT18) passaram pelo procedimento de aplicação, em seus respectivos ZT's e em dias alternados, de 10 injeções (s.c) de solução 0,1 mg/kg de reserpina. Em todos os grupos, o n total de 41 animais foi dividido em 2 subgrupos de injeções em distintas horas de zeitgebers (ZTs), onde o ZT 12 é definido como o momento de apagar das luzes do biotério, sendo estas realizadas no ZT 6 (n = 19), fase de claro, ou ZT 18 (n = 22), fase de escuro. Os animais foram submetidos a testes comportamentais para comportamento de catalepsia diariamente. Contando o tempo de habituação, registro de atividade e administração, foram um total de 40 dias de experimentação. Os ratos de todos os grupos foram sacrificados 48h após a última injeção. Os animais correspondentes a cada subgrupo de ZT de administração foram sacrificados e perfundidos nos mesmos ZTs de injeção (ZT6 e ZT18), podendo ser no seu mesmo ZT ou no ZT invertido. Os encéfalos dos animais perfundidos foram então submetidos a procedimentos de imunistoquímica para análises morfométricas (Fig.5).

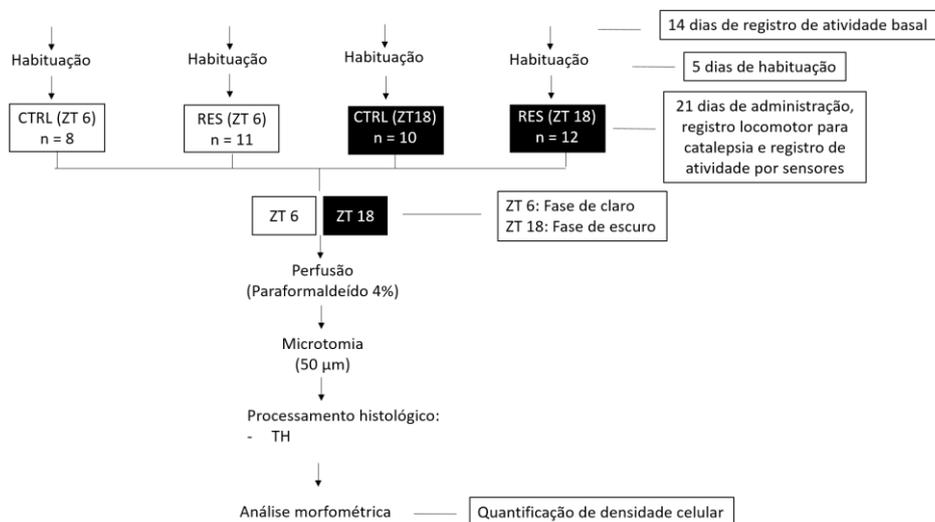


Figura 5. Desenho experimental da pesquisa

5.3 Procedimentos experimentais

5.3.1 Registro de atividade e repouso

Antes do período de habituação de 5 dias, todos os animais foram divididos em caixas com 4 indivíduos e para um registro basal de 14 dias da atividade desses animais, antes de começar o protocolo de reserpina e no decorrer do mesmo. Esse registro foi continuamente medido por um programa caseiro de computador Software Sap (software de acionamento programado), usando sensores de movimento (HC-SR501) que foram colocados 10 cm acima da caixa dos animais.



Figura 6. Aparato experimental para o registro dos ritmos de atividade e repouso, através de sensores

5.3.2 Teste de catalepsia

Todos os animais foram submetidos a este teste antes da 1ª injeção e sucessivamente por todos os 21 dias de experimentação. O comportamento de catalepsia foi avaliado colocando-se as patas dianteiras do animal sobre uma barra de vidro horizontal elevada a 9,0 cm da superfície na qual está apoiada suas patas traseiras. O tempo que cada animal fica nessa posição é quantificado em segundos, até um limite de 180s. É utilizado o valor da média de três exposições consecutivas.



Figura 7. Aparato experimental para o teste de Catalepsia. Foto retirada de (Diógenes et al., 2017 - dados não publicados)

5.3.3 - Perfusão e microtomia

Ao final do tratamento e teste comportamental, todos os ratos de cada grupo de injeção foram divididos aleatoriamente entre os ZT6 e ZT18 e anestesiados via intraperitoneal utilizando tiopental na dose de 90 mg/kg do peso do animal. Em seguida foram perfundidos transcárdicamente com infusão de solução salina 0,9% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), com o objetivo de prevenir a formação de coágulos e possibilitar uma melhor penetração do fixador nos tecidos. Logo após é feita a infusão de solução fixadora (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4) através de uma bomba peristáltica. Os encéfalos foram coletados por craniotomia e pós-fixados na solução fixadora com a adição de 30% de sacarose por 24h e então a solução é trocada por outra de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 para crioproteção. Foram feitas secções frontais de 50µm distribuídas em 5 poços contendo solução anticongelante a base de etilenoglicol e tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

Cada um desses poços 1 de 5 secções, de modo que as secções tenham uma distância de aproximadamente 250µm. Após esse processo, os cortes foram armazenados a 4°C até o procedimento de imunoistoquímica.

5.3.4 - Imunoistoquímica

As secções passaram pelo processo de imunoistoquímica utilizando o protocolo do complexo avidina-biotina peroxidase (ABC). Primeiramente, os cortes passaram por uma série de 5 lavagens de 8 minutos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (TF 0,1M) sob agitação automática e, em seguida, pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PBS por 20 minutos para inativação das peroxidases endógenas. Após esse processo, os cortes foram novamente lavados em uma nova série de 5 x 5 minutos em TF 0,1M. Logo após, foram incubados em solução de anticorpos primários específicos para TH obtido em coelho [1:5000], diluídos em TF 0,1M contendo 0,4% de solução Triton-X 100/TF e 2% de albumina bovina durante um período de 18h a 25°C. Posteriormente, as secções passaram por outra série de lavagens 5 x 5 minutos em TF 0,1M e foram incubados em solução com anticorpo secundário biotilado anti-coelho, diluído em Triton-X 100 a 0,4% por 2 horas. Concluída esta etapa, as secções passarão por uma nova etapa de lavagens 5 x 5 minutos TF 0,1M e foram incubadas em solução de avidina-biotina (0,5%) previamente diluída (30 minutos antes) em TF 0,1M com 0,4% de Triton-X 100/NaCl por 2 horas. Na última etapa, as secções passaram por nova série de lavagens de 5 x 5 minutos TF 0,1M e incubadas em solução a 0,05% de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma Company, EUA) por 5 minutos para a deposição do cromógeno. Após serem montados em lâmina, as secções foram submetidas a uma bateria de desidratação álcoois 70%, 80%, 90% e 100% e xileno, por um minuto cada. Logo depois as lâminas são cobertas por lamínulas em meio de inclusão (Entellan, Merck) para então serem visualizadas em microscópio óptico (Olympus BX-41). As imagens foram digitalizadas usando a câmera (Nikon, DMX-1200), para a análise morfométrica de densidade celular utilizamos o Image J para a contagem e delimitação das áreas a serem contadas. Para cada animal, foram analisadas 4 secções coletadas sistematicamente ao longo do eixo rostrocaudal. Ao final normalizamos o tamanho das áreas e pudemos observar a média da quantidade de células por mm² de cada animal.

5.4 - Análise estatística

O teste comportamental de catalepsia foi comparado entre os grupos através de uma ANOVA de 2 vias com múltiplas comparações, seguido do teste de Tukey. A contagem de células foi submetida a uma mensuração das suas áreas e calculado a quantidade de células por mm² se tinha nessa área, posteriormente foi realizada uma análise de variância (ANOVA de uma via) seguido do

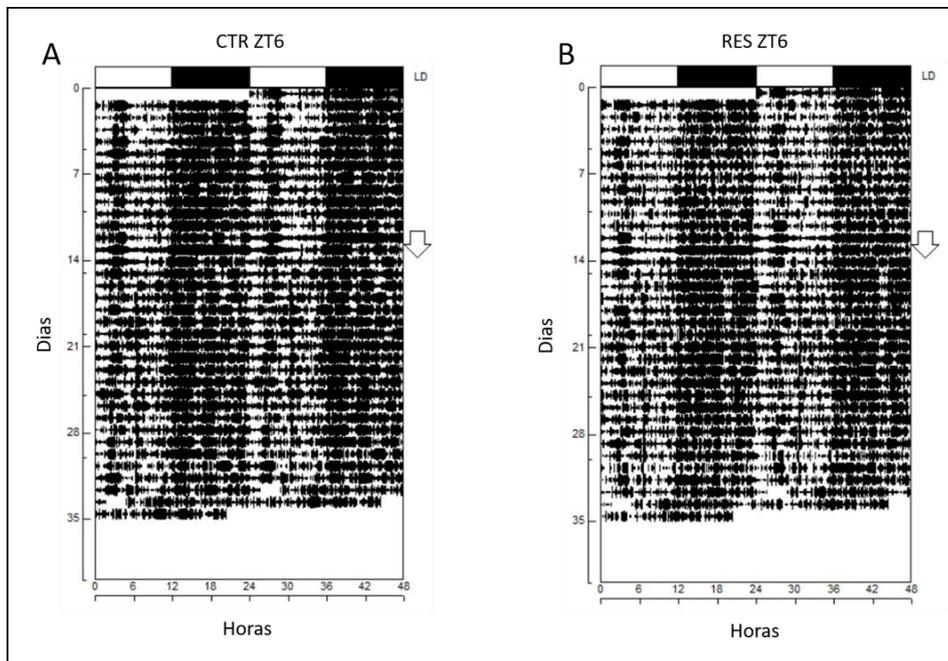
teste de Tukey. Os resultados do registro de atividade foram analisados através de um ANOVA de duas vias. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M. com $p < 0,05$ denotando resultados significativamente diferentes. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad prism versão 6.01.

6. Resultados

6.1 - Registro de atividade - repouso

Os dados abaixo estão plotados em actograma duplo de 48 horas. Os actogramas mostram a análise do ritmo de atividade repouso de 4 animais, representantes de cada um dos grupos experimentais durante um período de 35 dias (figura 8). É possível observar que comparativamente não há alteração no padrão de expressão do ritmo de atividade repouso, independente da ZT (6 ou 18), bem como do protocolo (CTR ou RES). (Fig 6). A seta indica o fim do período basal e início do protocolo da reserpina

Comentado [RE1]: Precisa fazer um check list nas fuguras, veja que essa estava com a indicação errada.



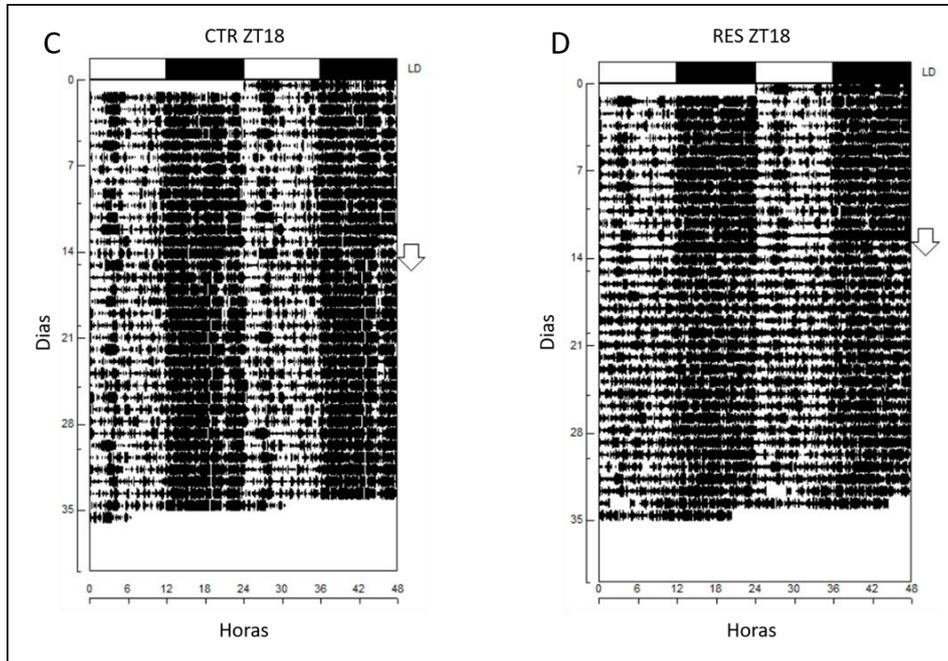


Figura 8. Actograma duplo para o registro de atividade dos animais dos grupos: A) CTR ZT6, B) RES ZT6, C) CTR ZT18, D) RES ZT 18.

Na análise dos periodogramas do qui-quadrado, foi observado que os ritmos de atividade de todas as caixas foram sincronizados por um período de cerca de 24h (1440 min) (figura 9), confirmando as análises dos comportamentos expressos nos actogramas. Na ANOVA de duas vias, foi observado que não há variação no período de atividade-reposo do animal entre o período basal e tratamento [$F(3, 6) = 0,9951, P > 0,05$], também não foi visto efeitos de interação entre esses dois momentos [$F(3, 6) = 1,997, P > 0,05$] e apresentou uma variação no percentual de variância ao longo do tempo [$F(1, 6) = 31,05, P < 0,05$].

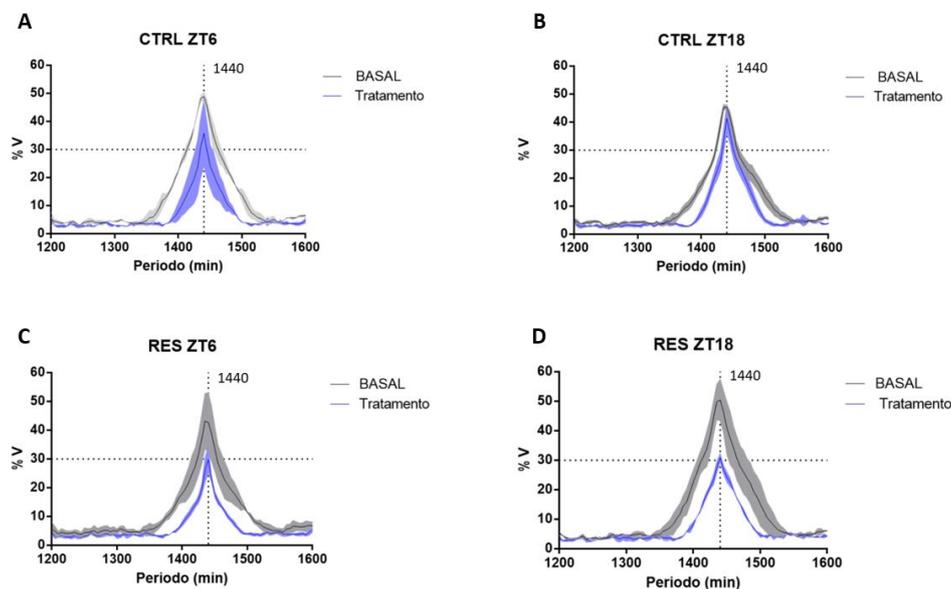


Figura 9. Periodogramas dos grupos (A) CTRL ZT6, (B) CTRL ZT18, (C) RES ZT6 e (D) RES ZT18. Linha pontilhada horizontal representa 30% V, valor no qual consideramos o limite inferior da robustez do ritmo. Linha vertical equivale ao período de 1440 min (24h).

6.2- Comportamento de catalepsia

Em uma ANOVA de 2 vias foi revelado que existem diferenças significativas no tempo [$F(10, 360) = 25,35, P < 0,05$], tratamento (CTR ZT6, CTR ZT18, RES ZT6 e RES ZT18) [$F(3, 36) = 9,715, P < 0,05$] e efeito de interação tempo x tratamento [$F(30, 360) = 8,432, P < 0,05$]. Já em uma ANOVA de duas vias com múltiplas comparações, podemos ver que a administração crônica de baixas doses de reserpina causou um aumento de maneira gradual no tempo de permanência na barra de catalepsia no grupo RES ZT6 e no grupo RES ZT18, tendo uma resposta mais tardia neste último. Estes grupos apresentaram diferenças significativas entre eles no período do 7º ao 9º dia de tratamento ($P < 0,05$). Em relação as diferenças com os grupos CTR, o RES ZT6 apresentou uma diferença significativa a partir do 7º dia de tratamento ($P < 0,05$), enquanto que o RES ZT18 só apresentou esta diferença a partir do 8º dia de tratamento ($P < 0,05$). Já no 10º dia de tratamento, os grupos RES ZT6 e ZT 18 deixam de apresentar diferenças significativas entre si ($P < 0,05$), mas continuam a apresentar diferenças significativas com os grupos CTR ZT6 e ZT18 ($P < 0,05$).

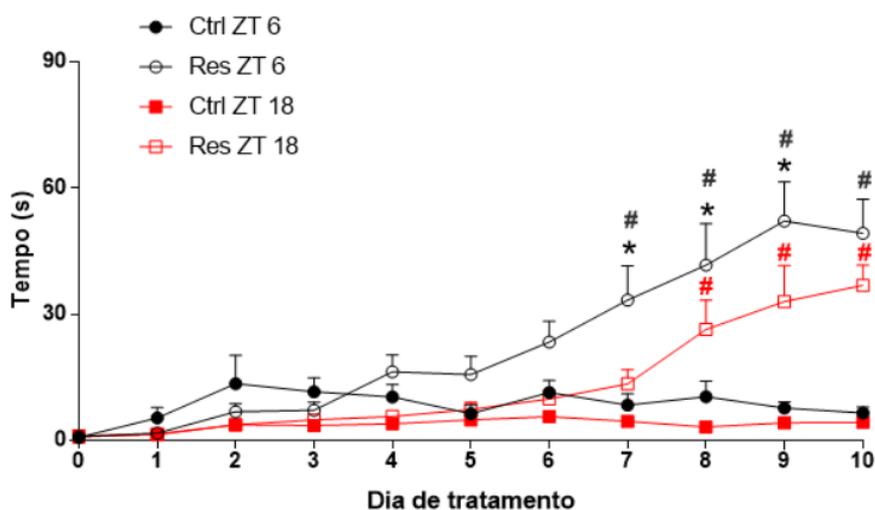


Figura 10. Efeito (Média \pm D.P) do tratamento utilizando reserpina 0,1 mg/kg (grupo RES ZT6 – n=11 e grupo RES ZT 18 – n=12) ou controle (CTR ZT6 – n=8 e CTR ZT18 – n =10) no teste de catalepsia. No eixo X, os dias de tratamento indicam a aplicação de reserpina ou veículo. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA de 2 vias para múltiplas comparações, seguida por post hoc com teste de tukey. * $p < 0,05$ com relação a RES ZT6x RES ZT18; # $p < 0,05$ com relação ao grupo controle de mesmo ZT (RES ZT6 x CTR ZT6 e RES ZT18 x CTR ZT18).

6.3- Imunoistoquímica

Para a contagem de células de TH+, foi feita uma ANOVA de uma via que revelou não existir diferenças significativas no número de células de TH+ da SNPC entre os grupos RES (ZT6 e ZT18) quando comparados com os grupos CTR (ZT6 e ZT18) [F (3, 20) = 2,335, $P > 0,05$] (figura 11 – C), enquanto no SNL foi vista uma diferença na ANOVA [F (3,20) = 3,159, $P < 0,05$] (figura 11 – B), mas quando realizada a análise com múltiplas comparações essa diferença desaparece. Já no VTA, foi visto uma diferença significativa no número de células TH+ no grupo RES ZT18 [F (3, 18) = 9,619, $P < 0,05$] (figura 11 – A), onde o grupo apresenta uma diminuição no número dessas células em relação ao grupo CTR ZT18, essas análises foram baseadas nos dados encontrados na tabela 1. Em uma análise qualitativa é possível notar uma diminuição da marcação de células TH+ nas áreas observadas (SNpc, SNL e VTA), quando examinados caso a caso, como visto nas Figs. 14 e 15.

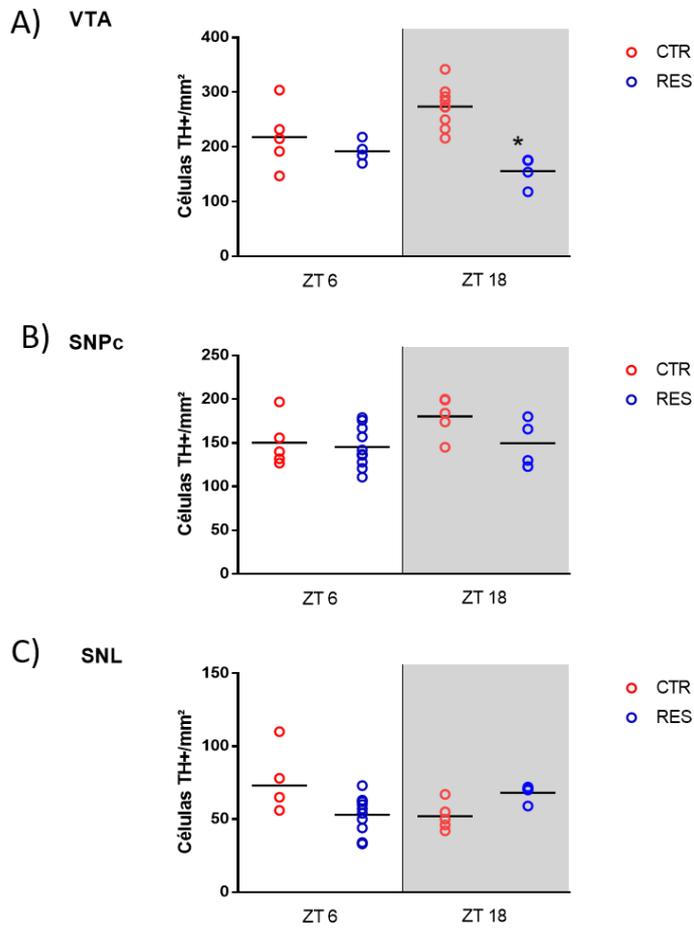


Figura 11. Análise imunohistoquímica de células TH+ nas regiões do VTA, SNpc e SNL dos grupos CTR e RES em diferentes ZTs de aplicação da reserpina (ZT6 e ZT18). As células de TH+ da (A) área tegmentar ventral, (B) Substância negra parte compacta e (C) Substância negra lateral foram plotadas como média \pm S.E.M.

Núcleo	ZT	Tratamento	
		RES	CTR
VTA	6	192,3 ± 20,21	218 ± 57,70
	18	155,8 ± 27,13	273,8 ± 37,75
SNPc	6	180,4 ± 22,57	150,4 ± 28,27
	18	149,8 ± 27,60	145,4 ± 23,38
SNL	6	52 ± 9,67	73 ± 22,56
	18	68 ± 6,05	53 ± 12,90

Tabela 1. Contagem de células TH+ dos grupos submetidos ao protocolo de reserpina. Dados expressos como média ± desvio padrão.

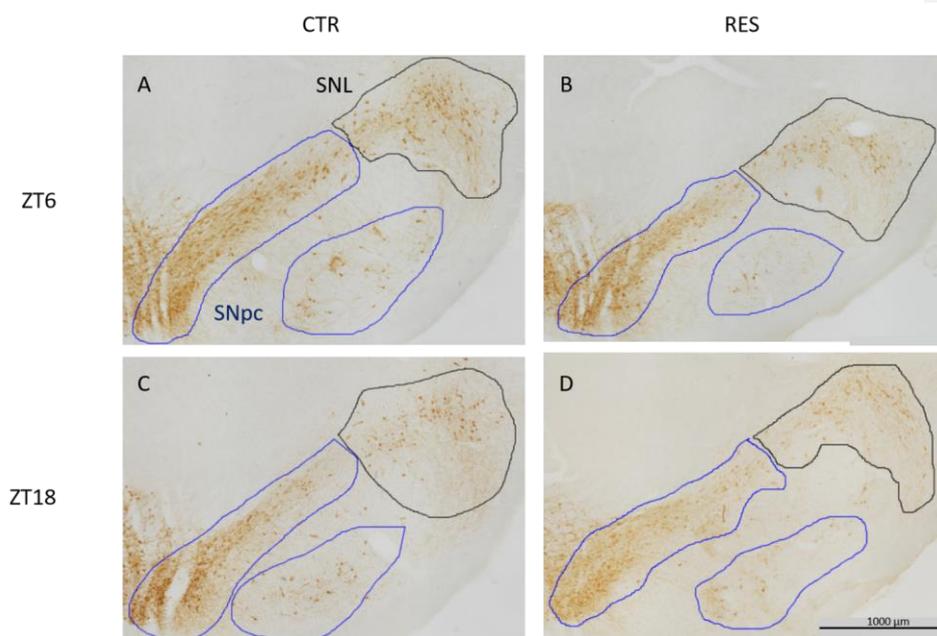


Figura 12. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encefálo do rato, mostrando a imunohistoquímica para células TH+ nas regiões da substância negra parte compacta (SNpc) em azul e lateral (SNL) em preto. A) Grupo CTR ZT6, B) Grupo RES ZT6, C) Grupo CTR ZT18, D) Grupo RES ZT18.

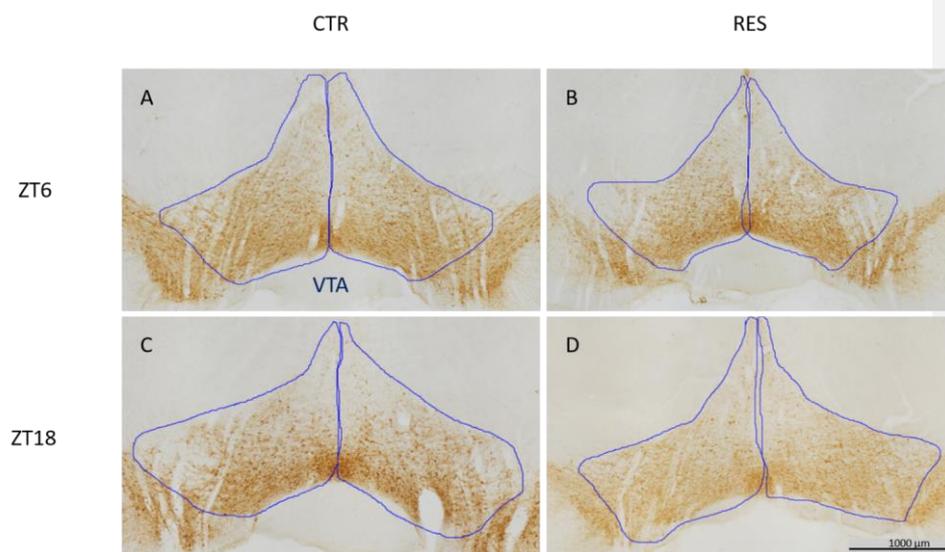


Figura 13. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encefálo do rato, mostrando a imunistoquímica para células TH + na região tegmentar ventral (VTA). A) Grupo CTR ZT6, B) Grupo RES ZT6, C) Grupo CTR ZT18, D) Grupo RES ZT18.

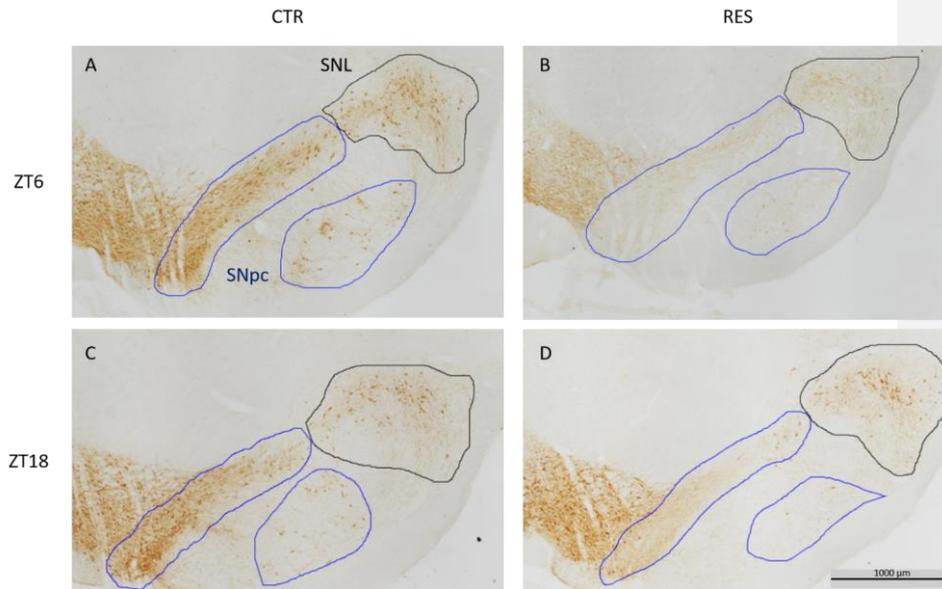


Figura 14. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encéfalo do rato, mostrando a imunohistoquímica para células TH + na região do SNpc (azul) e SNL (preto). A) CTR ZT6, B) RES ZT6, C) CTR ZT18, D) RES ZT18.

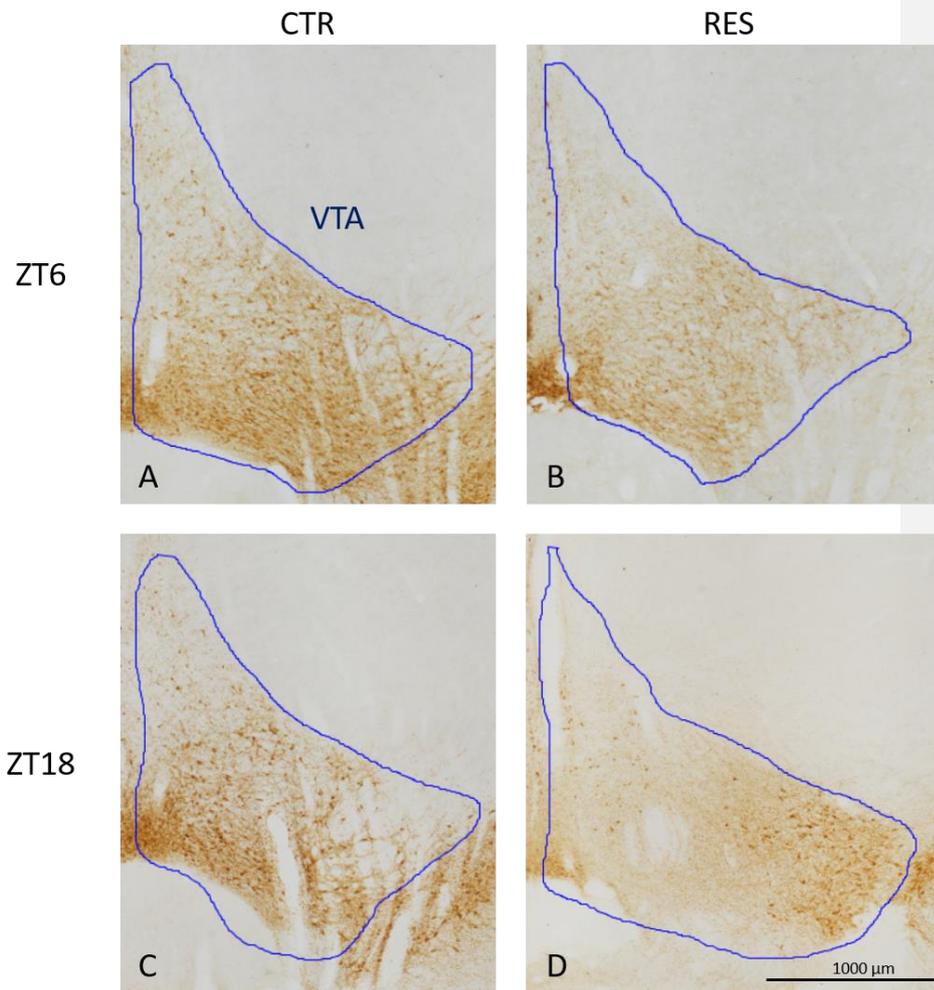


Figura 15. Fotomicrografia em campo claro de secções coronais do encéfalo do rato, mostrando a imunohistoquímica para células TH + na região tegmentar ventral (VTA). A) CTR ZT6, B) RES ZT6, C) CTR ZT18, D) RES ZT18.

7. Discussão

Nesta pesquisa, nós avaliamos e comparamos os efeitos motores clássicos, o ritmo de atividade-reposo e alteração neuroquímica da administração de reserpina, em um dos poucos modelos crônicos bem consolidado da DP (Santos et al., 2013), em 2 fases distintas de aplicação do fármaco (claro - ZT 6 / escuro - ZT 18), a fim de avaliar a diferença da resposta oxidativa dos animais em cada um desses momentos. Hoje já se sabe que boa parte das nossas respostas fisiológicas funcionam de forma rítmica, levando em consideração o genótipo animal (Ko & Takahashi, 2006). Dentre essas, as respostas ao estresse oxidativo, têm se mostrado como uma função rítmica ótima na luta contra diversos danos que podem resultar em desordens neurodegenerativas (Hood & Amir, 2017). Um exemplo entre essas desordens e devido sua proporcionalidade de aparecimento, a DP tem sido efetivamente pesquisada, principalmente pelo fato de um de seus disparadores estarem ligados ao acúmulo de radicais livres (Maiti et al., 2017). Essa desordem neurodegenerativa tem apresentações clássicas com sintomas motores e cognitivos e não clássicas com alterações autonômicas e de ritmos circadianos, o que torna ainda mais complexa a sua fisiopatologia (Elbaz et al., 2016).

Similiar ao que é mostrado por Santos et al., 2013, foi visto que a reserpina causa déficits motores significativos, avaliados por meio do teste de catalepsia, a partir da sétima (7ª) dose de administração na fase de claro do animal (animais reserpina- claro; RES-ZT6). Já na fase de escuro (animais reserpina-escuro; RES-ZT 18) o déficit também é crescente de acordo com o número de doses, no entanto, os sintomas motores só são vistos a partir da oitava (8ª) dose de reserpina e com uma amplitude relativamente menor, quando comparado ao déficit apresentado pelos animais RES-ZT6, conforme observado na figura 8. O que demonstra um status de resposta de proteção oxidativa, quando levada em consideração o cronotipo do animal para aplicação do fármaco. Na análise do ritmo de atividade repouso dos grupos não foi vista nenhuma alteração no período de atividade e repouso do animal, mas foi apresentada uma variação nas curvas ao longo do tempo (Fig. 7), mas ao realizar a comparação múltipla não foi visto aonde exatamente estava a diferença. Com relação a análise Imunoistoquímica para TH, foi visto uma diferença significativa apenas entre o grupo RES ZT18 em relação ao seu controle na região do VTA (Fig. 9 - A). Usando a ANOVA de uma via foi visto uma diferença na região da SNL (Fig.9 - C), porém quando realizada a comparação múltipla não foi visto onde se encontrava essa diferença, o que não está de acordo com os estudos anteriores, os quais os animais tratados com reserpina apresentam perda de células TH positivas na SNpc e VTA.

A reserpina atua inibindo o transportador vesicular de monoaminas (VMAT), ocasionando um acúmulo dessas monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) (Duty & Jenner, 2011; Leão et al., 2015) no neurônio pré-sináptico, esse acúmulo que acontece pela não estocagem e liberação dessas monoaminas, que nesta situação pode ter um efeito tóxico para a célula, e em consequência

disto o EO intracelular é ampliado, podendo ocasionar a morte neuronal dopaminérgica (Leal et al., 2016) e em decorrência da perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc o influxo de dopamina no estriado é diminuído, originando os sintomas motores da DP (Elbaz et al., 2016; Williams-Gray & Worth, 2016). Esses danos celulares causados pelo EO, podem ser evitados pela ação dos agentes antioxidantes (Birben et al., 2012), como a SOD, catalase, GST, vitaminas, zinco, cobre entre outros (Rahman, 2007). Já foi visto que a ação desses antioxidantes possuem padrões rítmicos de expressão e em alguns casos, esse pico de expressão ocorre no período de atividade do roedor (Wilking et al., 2013), como exemplo podemos citar a SOD que possui um maior nível de expressão na fase de escuro, em hamsters (Tomas-Zapico et al., 2003) e atua convertendo o superóxido em moléculas mais estáveis e menos danosas que podem ser eliminadas, na forma de água, pela via da glutathione peroxidase (Rahman, 2007). Essa flutuação nos picos de expressão de alguns antioxidantes nos mostram que pode haver uma maior vulnerabilidade do animal ao EO na fase de claro do que na fase de escuro. Essa fase de maior atividade dos agentes antioxidantes na fase de atividade do animal pode caracterizar o efeito visto em nosso trabalho, com o retardo do aparecimento do déficit motor no grupo RES-ZT18, bem como, a diminuição da amplitude desse efeito.

Os sintomas não-motores da DP também tem mostrado interesse de pesquisa devido alguns estudos evidenciarem que eles precedem os sintomas motores em até uma década (Williams-Gray & Worth, 2016), e por isso, podem servir como um possível preditor dessa desordem. Dentre esses sintomas, as mudanças relacionadas com análises de ritmos biológicos, parece possuir uma das mais fortes correlações com o aparecimento da DP (Videnovic & Golombek, 2017). Em um estudo de nosso laboratório utilizando o mesmo protocolo crônico de reserpina de nosso trabalho, Montenegro et al., (2016- Dados não publicados) conseguiu encontrar uma significativa mudança rítmica precedente a alteração motora com sintomas como avanços de fase e fragmentação do sono. Neste trabalho, apesar das semelhanças entre os protocolos, os resultados obtidos não corroboram com o trabalho anterior, pois não foi vista nenhuma alteração do sono nos animais tratados. Essa diferença pode ter acontecido pelo fato da nossa análise de ritmo do animal ter sido feita em grupos de quatro animais por caixa, enquanto o costumeiro é usar apenas um animal por caixa.

A análise dos sintomas motores são classicamente utilizadas para que seja confirmado a consolidação do modelo de DP utilizando pequenas doses de reserpina conforme Santos et al., 2013. Essa análise é feita utilizando o teste de catalepsia, a qual nos permite avaliar o aumento gradual da dificuldade do animal em iniciar o seu movimento (bradicinesia), sintoma que o animal adquire ao longo do tratamento e se inicia no 8º dia de tratamento, como mostrado em diversos estudos (Fernandes et al., 2012; Leão et al., 2017; Santos et al., 2013). Nossos resultados de catalepsia corroboram com esses estudos quando observamos os animais que receberam as injeções de reserpina

durante a fase de claro, próximo ao horário em que ocorreram as injeções feitas em algumas publicações (Fernandes et al., 2012; Leão et al., 2017; Santos et al., 2013). De modo adicional, nosso trabalho indica que possa existir uma maior resistência em atingir esses déficits motores quando a droga é injetada na fase de atividade do animal e de maior expressão de moléculas antioxidantes do animal (ZT 18), visto que a sua curva de perda locomotora apresenta um crescimento tardio. Sugerindo assim a importância de se levar em conta a fase de atividade do animal nos diversos protocolos para a indução da DP e principalmente que possa existir uma pequena janela de resistência ao crescimento do EO, mas que ela é rapidamente superada e ao final do tratamento o resultado da perda locomotora é semelhante ao grupo que recebeu o tratamento em sua fase de descanso (ZT6).

A perda de neurônios dopaminérgicos é um dos principais fatores que levam a perda locomotora observada no modelo da DP utilizando pequenas doses de reserpina, como visto em Santos et al., 2013. Essa perda neuronal é causa dos déficits motores quando atinge uma redução de 60-80% dos neurônios dopaminérgicos em roedores (Abercrombie et al., 1995) e humanos (Hornvkiewicz, 1998). Essa perda afeta principalmente a SNpc e VTA o que leva a uma diminuição na concentração de dopamina no estriado dorsal (Elbaz et al., 2016; Leal et al., 2016). Nas análises imunoistoquímicas para células TH+ dos animais tratados na SNpc e VTA, como feito nos trabalhos anteriores (Brandão et al., 2017; Santos et al., 2013) é observada que existe uma perda no número dessas células na SNpc e no VTA. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não afirmam completamente o que é encontrado nos trabalhos anteriores, pois foi visto diminuição de células TH+ somente nos animais tratados na fase de escuro (ZT18) quando comparados ao seu controle e também uma diferença na ANOVA na SNL, mas quando realizado a análise com múltiplas comparações essa diferença não existe, ademais na SNpc não é vista nenhuma diferença significativa. Mas quando analisado caso a caso, essa diferença nos neurônios dopaminérgicos nas regiões da SNpc, VTA e SNL está presente em parte considerável dos casos, como demonstrado nas figuras 14 - 17. Essa diferença também pode indicar que existe uma grande diferença individual, ao tratamento com reserpina, entre os animais estudados.

Essa não concordância desses nossos resultados imunoistoquímicos com os trabalhos anteriores, podem estar atrelados a alguns erros metodológicos que podem ter ocorrido ao longo do processo, droga conservada em local inapropriado, erros no protocolo de imunoistoquímica ou até mesmo na contagem de células. Outra possibilidade para o aparecimento da perda motora sem perda de neurônios dopaminérgicos é que a reserpina atuou por outras vias que favorecem a perda motora e que não foram analisadas neste trabalho.

8. Conclusões

- O teste de avaliação motora (catalepsia) confirma a promoção do déficit motor com o protocolo crônico de pequenas doses (0,1 mg/Kg) de reserpina.
- Os animais do grupo ZT 6, fase de repouso do animal, apresentam os déficits motores mais cedo que os animais ZT18, fase de atividade do animal.
- O processo de resposta oxidativa deve estar diretamente relacionada a diferença encontrada entre os grupos no teste de catalepsia.
- Não houve diferença significativa no número de células de TH+ da Substância Negra entre os grupos RES e CTR
- Já no VTA, foi visto uma diminuição significativa no número de células TH+ no grupo RES ZT18
- Os dados imunistoquímico não corroboram os dados comportamentais encontrados e nem o que é visto na literatura.

9. Considerações finais

Podemos ver que parte de nossos dados são congruentes com o que se encontra na literatura, bem como com as hipóteses levantadas nesse trabalho. O nosso principal desafio nos resultados encontrados, foi tentar entender a não perda de TH+ nos animais RES ZT6 (principalmente) e nos ZT18. Esse resultado de perda de neurônios já é bem consolidado na literatura, assim como em nosso laboratório, em trabalhos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo de injeção de reserpina. Acreditamos que possa ter ocorrido uma falha metodológica, durante o processo de imunistoquímica, é possível que o anticorpo primário não tenha entrado diretamente em contato com alguns cortes, o que diminuiu a sua marcação após revelação.

Além disso, nosso trabalho está muito relacionado a comprovação de atividade anti-oxidante, a partir da caracterização do ritmo do animal, como um agente que pode criar falsos positivos e/ou negativos durante o estabelecimento de um protocolo de intervenção animal. Tínhamos pensado em fazer análises imunistoquímicas que pudessem comprovar, de forma indireta, esse efeito de resposta oxidativa nos grupos. Para isso, fizemos imunistoquímica para os marcadores de resposta inflamatória, Iba I e GFAP. No entanto, devido a pandemia do COVID 19, não foi possível ser feito as fotografias e as análises desses marcadores. No entanto, temos o compromisso de mesmo após defesa, fazer análise desses marcadores e com o material restante, se for possível, de outros marcadores.

10. Referências

- Abercrombie, E. D., DeBoer, P., & Heeringa, M. J. (1995). Biochemistry of Somatodendritic Dopamine Release in Substantia Nigra: An in Vivo Comparison with Striatal Dopamine Release. *Advances in Pharmacology*, 42(C), 133–136. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60713-9](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60713-9)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Brandão, L. E. M., Nôga, D. A. M. F., Dierschnabel, A. L., Campêlo, C. L. D. C., Meurer, Y. D. S. R., Lima, R. H., Engelberth, R. C. G. J., Cavalcante, J. S., Lima, C. A., Marchioro, M., Estevam, C. D. S., Santos, J. R., Silva, R. H., & Ribeiro, A. M. (2017). Passiflora cincinnata Extract Delays the Development of Motor Signs and Prevents Dopaminergic Loss in a Mice Model of Parkinson's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/8429290>
- Cavalcante, J. D. S., Silva, E., Stela, M., & Oliveira, M. De. (2006). Componentes centrais do sistema de temporização circadiana : o núcleo supraquiasmático e o folheto intergeniculado. *Neurociências*, 3, 273–282.
- Chen, Y., & Zweier, J. L. (2014). Cardiac Mitochondria and Reactive Oxygen Species Generation. *Circulation Research*, 114(3), 524–537. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300559>
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 517–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
- Diógenes, K. (2017). *Diminuição da expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em áreas específicas do sistema nervoso central de roedores submetidos a um tratamento crônico com reserpina.*
- Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1357–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., & Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue Neurologique*, 172(1), 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>
- Fahn, S. (2015). The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Movement Disorders*, 30(1), 4–18. <https://doi.org/10.1002/mds.26102>
- Fanjul-Moles, M. L., & López-Riquelme, G. O. (2016). Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/7420637>
- Fernandes, V. S., Santos, J. R., Leão, A. H. F. F., Medeiros, A. M., Melo, T. G., Izídio, G. S., Cabral, A., Ribeiro, R. A., Abílio, V. C., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2012). Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 231(1), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.008>
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending Healthy Life Span--From Yeast to Humans. *Science*, 328(5976), 321–326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Franco-Iborra, S., Vila, M., & Perier, C. (2018). Mitochondrial Quality Control in

- Neurodegenerative Diseases: Focus on Parkinson's Disease and Huntington's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12(MAY), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00342>
- Guo, J., Zhao, X., Li, Y., Li, G., & Liu, X. (2018). Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 1817–1825. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3406>
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13332224>
- Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Larsen, P. J., & Mikkelsen, J. D. (2003). Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 25(4), 293–310. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(03\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(03)00042-5)
- Hendrickson, A. E., Wagoner, N., & Cowan, W. M. (1972). An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 135(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/BF00307084>
- Honma, S. (2018). The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(3), 207–219. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0597-5>
- Hood, S., & Amir, S. (2017). Neurodegeneration and the Circadian Clock. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00170>
- Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S., & Khurana, S. (2016). Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 9(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00503>
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine : Functions , Signaling , and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl_2), R271–R277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Koike, N., Yoo, S.-H., Huang, H.-C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T.-K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science*, 338(6105), 349–354. <https://doi.org/10.1126/science.1226339>
- Kondratov, R. V. (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & Development*, 20(14), 1868–1873. <https://doi.org/10.1101/gad.1432206>
- Kondratov, R. V., Vykhovanets, O., Kondratova, A. A., & Antoch, M. P. (2009). Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1. *Aging*, 1(12), 979–987. <https://doi.org/10.18632/aging.100113>
- Krishnan, N., Davis, A. J., & Giebultowicz, J. M. (2008). Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(2), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.011>
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879–44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>

- Leal, P. C., Lins, L. C. R. F., de Gois, A. M., Marchioro, M., & Santos, J. R. (2016). Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience, 10*(JUN), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00283>
- Leão, A. H. F. F., Meurer, Y. S. R., da Silva, A. F., Medeiros, A. M., Campêlo, C. L. C., Abílio, V. C., Engelberth, R. C. G. K., Cavalcante, J. S., Izídio, G. S., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2017). 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, 9*(MAR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00078>
- Leão, A. H. F. F., Sarmiento-Silva, A. J., Santos, J. R., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2015). Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathology, 25*(4), 377–390. <https://doi.org/10.1111/bpa.12253>
- Lee, J., Moulik, M., Fang, Z., Saha, P., Zou, F., Xu, Y., Nelson, D. L., Ma, K., Moore, D. D., & Yechoor, V. K. (2013). Bmal1 and Clock Are Required for Adaptation to Circadian Disruption, and Their Loss of Function Leads to Oxidative Stress-Induced Cell Failure in Mice. *Molecular and Cellular Biology, 33*(11), 2327–2338. <https://doi.org/10.1128/MCB.01421-12>
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry, 80*(5), 780–787. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell, 153*(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Luo, Y., Li, Z., Peng, X., Xia, L., & Ma, L. (2017). Desipramine rescues emotional memory deficit induced by low doses of reserpine. *Behavioural Pharmacology, 28*(6), 441–449. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000318>
- Maiti, P., Manna, J., & Dunbar, G. L. (2017). Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational Neurodegeneration, 6*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0099-z>
- Marsili, L., Rizzo, G., & Colosimo, C. (2018). Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease: From James Parkinson to the Concept of Prodromal Disease. *Frontiers in Neurology, 9*(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00156>
- Masoro, E. J. (2007). Role of Hormesis in Life Extension by Caloric Restriction. *Dose-Response, 5*(2), dose-response.0. <https://doi.org/10.2203/dose-response.06-005.Masoro>
- Massari, C. M., López-Cano, M., Núñez, F., Fernández-Dueñas, V., Tasca, C. I., & Ciruela, F. (2017). Antiparkinsonian Efficacy of Guanosine in Rodent Models of Movement Disorder. *Frontiers in Pharmacology, 8*(OCT), 4–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00700>
- Moore, R. Y. (1995). Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research, 73*(1–2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00083-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00083-6)
- Moore, R. Y., & Card, J. P. (1994). Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *The Journal of Comparative Neurology, 344*(3), 403–430. <https://doi.org/10.1002/cne.903440306>
- Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology, 146*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/cne.901460102>

- Morin, L. P. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*, 243, 4–20. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.026>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Musiek, E. S., & FitzGerald, G. A. (2013). *Molecular Clocks in Pharmacology* (A. Kramer & M. Merrow (eds.); Vol. 217, pp. 243–260). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_10
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezdard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., ... Stoessl, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>
- Patel, S. A., Velingkaar, N. S., & Kondratov, R. V. (2014). Transcriptional Control of Antioxidant Defense by the Circadian Clock. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(18), 2997–3006. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5671>
- Pérez, V. I., Bokov, A., Remmen, H. Van, Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(10), 1005–1014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.003>
- Putamen, C., & Hornykiewicz, O. (1998). *Biochemical aspects of Parkinson's disease*. 7–10.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044138>
- Reiter, R. J. (1991). Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions*. *Endocrine Reviews*, 12(2), 151–180. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-2-151>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Galano, A. (2014). Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology*, 29(5), 325–333. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>
- Santos, J. R., Cunha, J. A. S., Dierschnabel, A. L., Campêlo, C. L. C., Leão, A. H. F. F., Silva, A. F., Engelberth, R. C. G. J., Izídio, G. S., Cavalcante, J. S., Abílio, V. C., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2013). Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. *Behavioural Brain Research*, 253, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.031>
- Shearman, L. P. (2000). Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science*, 288(5468), 1013–1019. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1013>
- Sian-Hülsmann, J., Mandel, S., Youdim, M. B. H., & Riederer, P. (2011). The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 118(6), 939–957. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07132.x>
- Sies, H., Cadenas, E., Symons, M. C. R., & Scott, G. (1985). Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 311(1152), 617–631. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0168>
- Sies, Helmut. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S31–S38. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)
- Sies, Helmut, Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

- Slater, T. F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*, 222(1), 1–15. <https://doi.org/10.1042/bj2220001>
- Sun, H., Huang, F. F., & Qu, S. (2015). Melatonin: A potential intervention for hepatic steatosis. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0081-7>
- Tomas-Zapico, C., Coto-Montes, A., Martinez-Fraga, J., Rodriguez-Colunga, M. J., & Tolivia, D. (2003). Effects of continuous light exposure on antioxidant enzymes, porphyrin enzymes and cellular damage in the Harderian gland of the Syrian hamster. *Journal of Pineal Research*, 34(1), 60–68. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.02951.x>
- Videnovic, A., & Golombek, D. (2017). Circadian dysregulation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*, 2, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2016.11.001>
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 551–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2013). Circadian Rhythm Connections to Oxidative Stress: Implications for Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(2), 192–208. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4889>
- Williams-Gray, C. H., & Worth, P. F. (2016). Parkinson's disease. *Medicine*, 44(9), 542–546. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2016.06.001>
- Yang, Z., Kim, H., Ali, A., Zheng, Z., & Zhang, K. (2017). Interaction between stress responses and circadian metabolism in metabolic disease. *Liver Research*, 1(3), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.11.002>
- Zhao, H., Eguchi, S., Alam, A., & Ma, D. (2017). The role of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(2), L155–L162. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00449.2016>

11. Anexos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 99229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



CERTIFICADO

Natal (RN), 05 de abril de 2019.

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito fase-dependente da reserpina na promoção do estresse oxidativo na via nigro-estriatal de ratos**”, protocolo 008/2019, **CERTIFICADO n.º 155.008/2019**, sob a responsabilidade de **Rovena Clara Galvão Januário Engelberth** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

Vigência do Projeto	Junho 2020					
RELATÓRIO	JULHO 2020					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade:		
				M	F	Total
<i>Rattus norvegicus alginus</i>	Wistar	≈3 meses	≈300-400g	160	0	160
Origem	Biotério Central – CB – UFRN					
Manutenção	Biotério de Experimentação do LENq – UFRN					

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. **O descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.**

Josy Cárghina Covan Pontes
Coordenadora da CEUA-UFRN
Gestão 2019-2010



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
 Fone: (84) 99229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



1) PROTOCOLO Nº : 008/2019

2) TÍTULO DO PROJETO:

Efeito fase-dependente da reserpina na promoção do estresse oxidativo na via nigro-estriatal de ratos

3) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Rovena Clara Galvão Januário Engelberth

4) DATA DA REUNIÃO

04/04/2019

5) RESUMO DO PROJETO:

A reserpina induz a falha na capacidade de armazenamento das monoaminas nas vesículas sinápticas, gerando uma depleção dessas substâncias no nervo terminal e aumento do estresse oxidativo (EO). Um grande corpo de evidências mostra que este fármaco causa o aparecimento de sintomas motores e não motores semelhantes aos vistos na doença de Parkinson, sendo seu protocolo de aplicação comumente executado durante a fase de claro. Alguns estudos, no entanto, sugerem que na fase de claro existe uma menor concentração de antioxidantes no organismo devido a oscilações diárias na produção de enzimas como a catalase e superóxido dismutase, além do neuro-hormônio melatonina, que apresentam picos durante a fase de escuro. Essas oscilações, portanto, podem representar uma vulnerabilidade dependente de fase a desordens decorrentes de danos a estrutura do DNA, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas. Muitos desses parâmetros de ritmicidade biológica não são levadas em conta no momento de padronização de modelos experimentais o que pode distanciar os resultados obtidos nesses animais da fisiopatologia de algumas desordens. Tendo em vista as interações da maquinaria circadiana e o EO, o objetivo deste trabalho é observar se o modelo farmacológico da reserpina em ratos (Santos et al., 2013), quando aplicado durante a fase de escuro, apresenta o mesmo efeito de indução dos sintomas da DP comparado com seu protocolo padrão de aplicação na fase de claro. Serão utilizados 160 animais com idade aproximada de 3 meses. Os animais serão submetidos à administração da reserpina em duas fases distintas, atividade e repouso; o efeito da droga será avaliado através do teste de catalepsia, em grupos de adição ou não de antioxidantes e melatonina. Posteriormente, serão avaliados parâmetros neuroquímicos relacionados à morte de neurônios dopaminérgicos, astrogliose reativa e estresse oxidativo na via nigro-estriatal.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral: Avaliar se existem mudanças no efeito de reserpina quando ela é aplicada no horário de atividade do animal para amparar as hipóteses de que: variações circadianas na expressão de proteínas e hormônios, alterando a resposta celular ao EO, podem afetar a eficácia da droga de acordo com o horário de aplicação.

Específicos: Avaliar a progressão dos déficits motores característicos do protocolo reserpina (Santos et al., 2013) quando comparado aplicações do fármaco em duas diferentes fases do animal, atividade e repouso; Avaliar o efeito de agentes exógenos anti-oxidantes, como a vitamina C, no protocolo reserpina, em duas fases distintas do animal, atividade e repouso; Avaliar o efeito da melatonina, aplicado exogenamente, no protocolo reserpina, em duas fases distintas do animal, atividade e repouso; Avaliar possíveis alterações neuroquímicas e de resposta anti-oxidante relacionadas com as diferentes fases de aplicação do protocolo reserpina

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Introdução e Justificativa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Orçamento e fonte financiadora	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários

www.ceua.propesq.ufrn.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 99229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



9) O PROJETO DESTA PESQUISA ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Adequado Comentários

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de invasividade (1, 2, 3, 4):

Se grau 3 ou 4, está em conformidade com a RN 39?

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral:

Sim Não

Substituição de Metodologia:

Sim Não

Aprimoramento da Metodologia:

Sim Não

Acomodação e manutenção dos animais:

Adequado Inadequado

Manipulação dos animais:

Adequado Inadequado

Analgesia dos animais (se aplicável):

Adequado Inadequado

Anestesia dos animais (se aplicável):

Adequado Inadequado

Eutanásia dos animais (se aplicável):

Adequado Inadequado

Pontos Finais Humanitários (se aplicável):

Adequado Inadequado

11) PARECER:

- Aprovado
 Recomendações
 Pendência
 Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Considerando a Resolução Normativa CONCEA n. 06, de 10/07/2012, a Resolução CFMV n. 1178, de 17/10/2017, e a Resolução CRMV-RN n. 012, de 25/03/2019, esta Comissão solicita o envio da Anotação de Responsabilidade Técnica (ART) em até 04 meses a partir desta data. O documento também deve ser anexado ao CIUCA, sistema de cadastro das instituições animais, para regularização do biotério junto ao CONCEA.