

MODELO FARMACOLÓGICO PROGRESSIVO DA DOENÇA DE PARKINSON: EFEITOS SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR E A PRESSÃO ARTERIAL DE TRÊS LINHAGENS ISOGENÉTICAS DE RATOS

Guilherme P. Fadanni^{1*}, Anderson H. F. F. Leão², Pâmela A. Ramborger¹, Aurea E. Linder³, Regina H. Silva², Geison S. Izídio^{1,4}.

1. Laboratório de Genética do Comportamento, Departamento de Biologia Celular, Embiologia e Genética, UFSC.
2. Laboratório de Neurociência Comportamental, Departamento de Farmacologia, UNIFESP.
3. Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Farmacologia, UFSC.
4. Orientador

Resumo:

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por bradicinesia, tremor, rigidez muscular e instabilidade postural. No presente estudo, investigou-se um modelo progressivo da DP em ratos. Foi administrada uma injeção de 0,1mg/kg de reserpina a cada 48h, durante 28 dias, em ratos das linhagens Lewis, SLA16 e SHR.

Os objetivos foram avaliar os efeitos do tratamento sobre o comportamento motor e pressão arterial sistólica, além de buscar contribuições genéticas para essas alterações. Os resultados mostraram que o tratamento com reserpina induziu prejuízos motores em todos os testes, assim como alterações de PAS, nas três linhagens.

Concluiu-se que este é um bom modelo para mimetizar aspectos comportamentais da DP em ratos, com ação anti-hipertensiva de baixa magnitude e capaz de demonstrar progressividade. A diferença entre as linhagens sugere também contribuição de genes do cromossomo 4 no aumento da manifestação de movimentos orais.

Autorização legal: Este trabalho foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética para o Uso de Animais local (CEUA/UFSC), conforme protocolo PP00903.

Palavras-chave: Reserpina; Ratos SHR; Movimentos orais.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, UFSC.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSC.

Introdução:

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada

principalmente pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra parte compacta (SNpc). A degeneração dessas células produtoras de dopamina causa depleção estriatal do neurotransmissor e o consequente desenvolvimento de sintomas motores (bradicinesia, tremor, instabilidade postural e rigidez muscular). Para investigar os mecanismos biológicos envolvidos na patogênese da DP, foram desenvolvidos modelos genéticos, farmacológicos e baseados em toxinas. O primeiro modelo a ser usado para essa finalidade, em roedores, foi a administração aguda de reserpina, com uma ou duas injeções de doses altas (1,0mg/kg ou mais).

Mais recentemente, propôs-se o tratamento repetido com baixa dose de reserpina como um modelo progressivo da DP em ratos. A reserpina, um bloqueador irreversível do transportador vesicular de monoaminas (VMAT), inibe o armazenamento neuronal de monoaminas causando depleção de serotonina, noradrenalina e dopamina na fenda sináptica. Na literatura, a administração crônica de baixa dose desta droga (0,1mg/kg) foi capaz de induzir prejuízos motores, cognitivos e de emocionalidade, além de simular características neuroquímicas importantes da DP.

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é frequentemente utilizada na pesquisa no modelo da reserpina. Trabalhos prévios sugerem que ratos SHR não desenvolvem discinesia oral induzida por tratamento agudo com dose alta da droga, quando comparados aos ratos Wistar. Dados recentes mostram que os ratos SHR parecem ser resistentes também à administração repetida de baixa dose de reserpina. Entretanto, as linhagens Lewis (LEW) e SHR.LEW-*Anxrr16* (SLA16), ainda não foram avaliadas no modelo da reserpina.

A linhagem SLA16 foi criada em nosso laboratório e é geneticamente idêntica à

linhagem SHR, com exceção de uma região do cromossomo 4, que é proveniente da linhagem LEW. Essa região cromossômica contém muitos genes direta ou indiretamente relacionados ao desempenho motor, cognitivo e de emocionalidade dos ratos.

No presente trabalho, objetivou-se investigar os efeitos do tratamento com baixa dose de reserpina sobre o comportamento motor e pressão arterial sistólica (PAS), além de avaliar a contribuição genética do cromossomo 4 nessas alterações.

Metodologia:

1. Animais e procedimentos gerais:

Utilizou-se 48 ratos machos das linhagens LEW, SHR e SLA16 com idade entre 6 e 7 meses. Eles foram mantidos em caixas-moradia em um ambiente com ventilação e temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes acesas às 07:00h) e água e alimento *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente entre um grupo RES (reserpina) e um VEH (veículo) para cada uma das linhagens. Os grupos RES receberam por via subcutânea a dose de 0,1 mg/kg da droga, a cada 48 horas, durante 28 dias, totalizando 14 injeções. Para cada grupo utilizou-se oito animais ($n=8$). Os grupos testados são os mesmos para todos os experimentos.

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas e *post hoc* de Duncan quando necessário. Utilizou-se o software *Statistica 10* (Statsoft, EUA).

2. Testes comportamentais.

Catalepsia em barra (CAT): consiste em uma barra de vidro fixada 9 cm acima do chão do aparato, na qual o animal é posicionado de modo a apoiar as duas patas dianteiras sobre a barra. Mediu-se o tempo em que o rato permaneceu nessa postura anormal durante três exposições consecutivas. Para interromper o cronômetro, o critério utilizado foi o primeiro movimento de qualquer uma das patas dianteiras. O teste de catalepsia foi realizado a cada 48h durante todo o tratamento.

Campo aberto (CA): consiste em uma caixa de madeira quadrada (100 x 100 cm) coberta com fórmica, contendo uma arena em preto fosco cercada por paredes brancas, de 40 cm de altura. Cada animal foi posicionado no centro do CA e testado durante 5 minutos. A ambulação total foi posteriormente analisada

pelo software de rastreamento ANY-maze (Stoelting, USA). O teste de campo aberto foi realizado 48h depois da 3^a, 7^a, 11^a e 14^a injeção, após o teste de catalepsia.

Movimentos orais (MO): a medida de movimentos orais foi realizada colocando os animais em gaiola gradeada (29 x 21 x 24 cm) onde foram observados durante 10 minutos. Para análise, foram registrados o número de protrusões de língua e o número de movimentos de mastigação que não sejam direcionados a nenhum objeto (mastigação ao vácuo). O teste de movimentos orais foi realizado 48h depois da 3^a, 7^a, 11^a e 14^a injeção, logo após o teste do campo aberto.

3. Aferição de pressão arterial sistólica (PAS)

Em razão da ação anti-hipertensiva pré-estabelecida da reserpina, realizou-se o acompanhamento do efeito da droga sobre a PAS dos grupos experimentais. Para as aferições, utilizou-se um medidor não-invasivo de pressão sanguínea (ML125 NIBP Controller, ADInstruments Pty Ltd., Australia). Os animais foram habituados por aproximadamente 30 minutos em um ambiente com temperatura mantida a 30°C . O número representativo da PAS foi composto pela média aritmética de três medidas registradas para cada período de medição. A aferição de todos os animais foi realizada 48h após a 4^a, 8^a e 12^a injeção.

Resultados e Discussão:

No presente estudo, investigou-se os efeitos da administração repetida de reserpina na dose de 0,1mg/kg sobre as linhagens LEW, SLA16 e SHR. Os resultados revelaram prejuízo motor induzido pela reserpina nas três linhagens em todos os testes. Além disso, os comportamentos distintos de ratos SLA16, no teste de movimentos orais, sugerem uma susceptibilidade para o desenvolvimento de discinesia oral (DO). Esse resultado sugere uma influência dos genes contidos na região diferencial do cromossomo 4 na manifestação da DO.

Para o teste de catalepsia em barra (**Figura 1**), a análise estatística revelou que os animais tratados com reserpina passaram mais tempo na barra, do que os respectivos controles, 48h após a 5^a injeção e da 7^a injeção até o fim do tratamento. Uma diferença da linhagem SHR para a linhagem LEW (48h após a 9^a injeção) ou para a LEW e SLA16 (48h após a 10^a e 11^a injeção) também foi constatada.

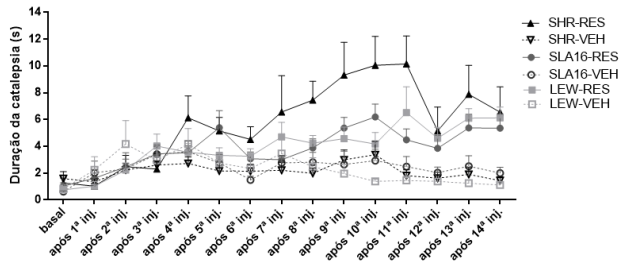


Figura 1. Efeito da administração repetida de reserpina 0,1mg/kg no teste de catalepsia em barra 48h após cada uma das injeções (efeitos estatísticos mencionados no texto). Resultados expressos em média \pm E.P.M. (n= 8/grupo).

No teste do campo aberto (**Figura 2**), a administração repetida de baixa dose de reserpina foi capaz de reduzir significativamente a locomoção total nas três linhagens testadas (de forma independente do tempo). A linhagem SLA16, por sua vez, exibiu maior atividade locomotora do que a linhagem LEW.

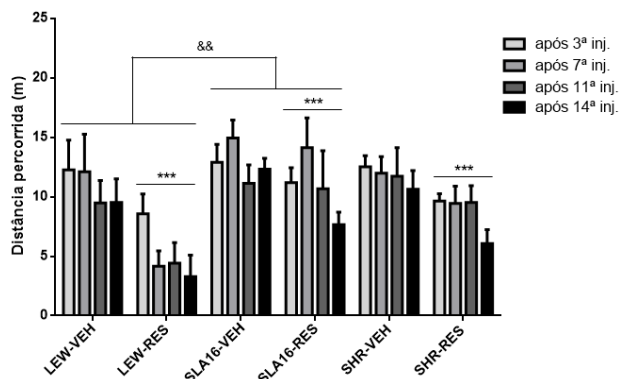


Figura 2. Efeito da administração repetida de reserpina 0,1mg/kg na distância total percorrida no teste de campo aberto 48h após a 3ª, 7ª, 11ª e 14ª injeção. ANOVA de medidas repetidas. *** p <0,001, efeito de tratamento. && p <0,01, efeito de linhagem. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (n= 8/grupo).

Para o teste de movimentos orais (**Figura 3**) o qual avaliou parâmetros de discinesia oral, encontrou-se diferenças na linhagem SLA16 em relação às linhagens LEW e SHR. Em ambos os comportamentos, a linhagem SLA16 manifestou aumento significativo e independente de tratamento ou tempo. Esse fenômeno revela uma contribuição da região diferencial do cromossomo 4 para a manifestação de mastigação ao vácuo e protrusão de língua. Paralelamente, os resultados mostraram que a reserpina foi capaz de induzir aumento do número de mastigações ao vácuo já a partir da 3ª injeção. Um aumento do prejuízo em relação ao que é registrado após a 3ª injeção também foi observado após a 11ª injeção. Essa exacerbação do efeito, portanto, representa uma possível progressividade. Quanto às protrusões de língua, diferenças para os grupos controle foram observadas 48h após a 11ª e a 14ª injeção.

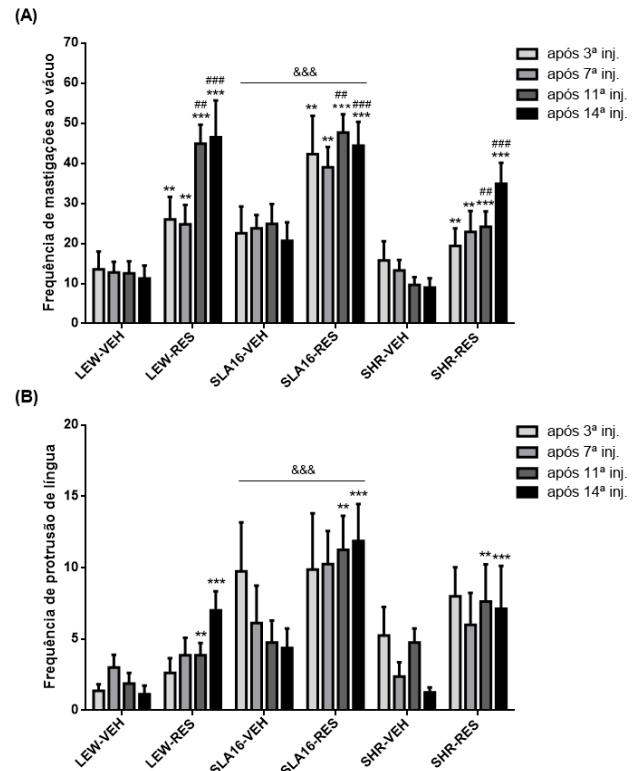


Figura 3. Efeito da administração repetida de reserpina 0,1mg/kg sobre a manifestação de (A) mastigações ao vácuo e (B) protrusões de língua no teste de movimentos orais, realizado 48h após 3ª, 7ª 11ª e 14ª injeção. ANOVA de medidas repetidas. ** p <0,01 e *** p <0,001, efeito de tratamento. &&& p <0,001, efeito de linhagem. ### p <0,01 e #### p <0,001, comparado ao período após 3ª injeção dentro do mesmo tratamento (*post hoc* de Duncan). Resultados expressos em média \pm E.P.M. (n= 8/grupo).

Por fim, a aferição de PAS (**Figura 4**) revelou que a reserpina reduz a pressão arterial observada nos três períodos de tempo analisados, mas de forma independente das linhagens e de uma maneira não-cumulativa. Apesar da diferença estatística, as linhagens com alta PAS (SLA16 e SHR) permanecem com a medida elevada, enquanto a linhagem normotensa (LEW) também mantém os valores de pressão relativamente próximos ao seu respectivo controle. Além disso, tal variação na PAS a médio prazo (protocolo experimental de 30 dias) dificilmente produziria efeitos fisiológicos de forma a influenciar o comportamento motor nos testes de catalepsia, movimentos orais ou campo aberto. De acordo com a literatura, a reserpina possui três vezes mais afinidade pelo VMAT2, presente em neurônios do sistema nervoso central, do que pelo VMAT1, presente em tecidos endócrinos e células parácrinas. Sugere-se, portanto, que a ação anti-hipertensiva da reserpina não é suficiente, com a dose de 0,1mg/kg, neste tempo de protocolo, para impactar o comportamento motor.

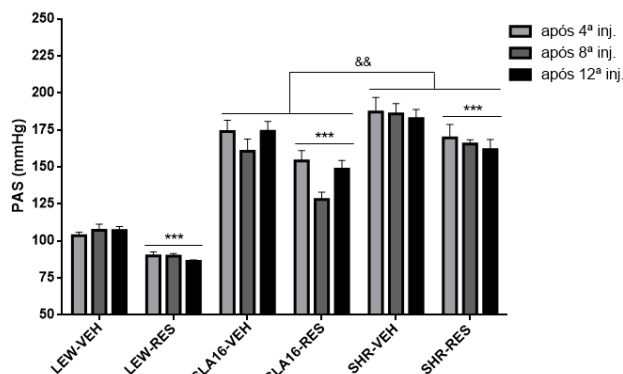


Figura 5. Efeito da administração repetida de reserpina 0,1mg/kg sobre a PAS 48h após a 4ª, 8ª e 12ª injeção. ANOVA de medidas repetidas. *** $p < 0,001$, efeito de tratamento. && $p < 0,01$, efeito de linhagem. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (n= 5/grupo).

O aumento gradual da latência no teste de catalepsia em barra, a redução da ambulação no campo aberto e o aumento da manifestação de movimentos orais corroboram dados observados em trabalhos anteriores (LEÃO et al., 2015). A respeito da PAS, não foram encontradas publicações que investiguem o efeito anti-hipertensivo da reserpina dentro de um protocolo de DP.

Sobre as linhagens, ainda que os estudos com a região diferencial do cromossomo 4 tenham décadas de existência, a linhagem SLA16 é relativamente recente na literatura, e não fora utilizada em modelos experimentais de DP anteriormente. A linhagem SHR, no entanto, é sugerida como resistente aos efeitos da reserpina quando comparada com a linhagem Wistar. Aqui, ainda que os valores observados indiquem prejuízos em relação aos animais controle, os comportamentos são semelhantes àqueles observados em trabalhos que discutem a linhagem SHR como resistente. Nesse aspecto, sugere-se que as três linhagens estudadas exibem relativa resistência aos efeitos da reserpina, exceto no que diz respeito à linhagem SLA16 no teste de movimentos orais.

Conclusões:

Este trabalho demonstrou que o tratamento com reserpina foi capaz de produzir prejuízos motores nas três linhagens em todos os comportamentos avaliados, também apresentando progressão da debilitação motora. Junto aos resultados de pressão arterial, conclui-se que a administração repetida de baixa dose de reserpina é um bom modelo para mimetizar aspectos comportamentais da DP em ratos, com ação anti-hipertensiva de baixa magnitude e capaz de demonstrar progressividade. Além disso, os

resultados acerca dos movimentos orais sugerem a comparação das linhagens SLA16 e SHR como uma ferramenta para investigar contribuições genéticas para a manifestação de parâmetros de discinesia oral.

Referências bibliográficas

ABÍLIO, V. C.; SILVA, R. H.; CARVALHO, R. C.; GRASSL, C.; CALZAVARA, M.B.; REGISTRO, S.; D'ALMEIDA, V.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FRILHO, R. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 2, p. 263–272. 2004

DE MEDEIROS, G. F.; PEREIRA, E.; GRANZOTTO, N.; RAMOS, A. Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **PLoS One**, v.8, n.12, e83666. 2013.

FERNANDES, V. S.; SANTOS, J. R.; LEÃO, A. H.; MEDEIROS A. M.; MELO T. G.; IZÍDIO G. S.; CABRAL A.; RIBEIRO R. A.; ABÍLIO V. C.; RIBEIRO A. M.; SILVA R. H. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 154–163. 2012.

KLOCKGETHER, T. Parkinson's disease: clinical aspects. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 115-120. 2004.

LEÃO, A. H.; SARMENTO-SILVA, A. J.; SANTOS, J. R.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain Pathology**, v. 25, n. 4, p. 377-390. 2015.

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. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) are resistant to a reserpine-induced progressive modelo of Parkinson's disease: differences in motor behavior, tyrosine hydroxylase and α -synuclein expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. 78. 2017.

QUEIROZ, C. M.; PIOVEZAN, R. D.; FRUSSA-FILHO, R. Reserpine does not induce orofacial dyskinesia in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 356, n. 2-3, p. 105–108. 1998.