

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Caroline Pilecco Barbosa

**DISCINESIA ESPONTÂNEA EM RATOS: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO  
DE MECANISMOS OXIDATIVOS E DOPAMINÉRGICOS**

Santa Maria, RS  
2017

**Caroline Pilecco Barbosa**

**DISCINESIA ESPONTÂNEA EM RATOS: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DE  
MECANISMOS OXIDATIVOS E DOPAMINÉRGICOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para o título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Roselei Fachinetto

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Barbosa, Caroline Pilecco

Discinesia espontânea em ratos: possível participação de mecanismos oxidativos e dopaminérgicos / Caroline Pilecco Barbosa.- 2017.

55 f.; 30 cm

Orientadora: Roselei Fachinetto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2017

1. Discinesia 2. Envelhecimento 3. Estresse oxidativo  
4. Monoaminoxidase I. Fachinetto, Roselei II. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Caroline Pilecco Barbosa. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: carolpilecco@gmail.com

**Caroline Pilecco Barbosa**

**DISCINESIA ESPONTÂNEA EM RATOS: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DE  
MECANISMOS OXIDATIVOS E DOPAMINÉRGICOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para o título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

**Aprovado em 17 de agosto de 2017:**

---

**Roselei Fachinetto, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Sara Marchesan de Oliveira, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Robson Puntel, Dr. (Unipampa)**

Santa Maria, RS  
2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a toda a minha família por sempre me transmitirem boas energias, fé, força e perseverança para seguir em busca do meu sonho. Agradecimento especial aos meus pais Vera Lucia e Luiz Sergio e ao meu irmão Victor pelo apoio incondicional que sempre me deram em qualquer decisão que eu tomasse. Obrigada por toda a compreensão, carinho e amor. Aos meus tios Vilma, Antônio (*in memoriam*) e Roberto pelo apoio que sempre me deram não só na graduação, mas durante o mestrado também. Sei que o tio Antônio estará sempre guiando nossos passos. Obrigada por todo o carinho transmitido.

Aos meus avós Neuza, Ilário e Nilza meu agradecimento especial pelo apoio a mim oferecido, sem vocês teria sido muito mais difícil chegar até aqui.

Ao laboratório 5209 (Neurotox) Alcindo, Ana Paula, Bárbara, Camila, Caroline Leal, Catiúscia, Elizete, Getúlio, Janaína, Jeane, Juliane, Larissa, Luis, Mariana, Mayara, Patrícia e Talita, meu muito obrigado pelo apoio não só durante os experimentos, mas também pela amizade e companheirismo partilhados.

Meu agradecimento especial à minha orientadora Roselei Fachinetto, que me deu oportunidade de seguir na pesquisa e por me proporcionar participar deste estudo, mesmo que não siga mais nessa linha, serei eternamente grata pela oportunidade e apoio a mim oferecido.

Aos meus amigos mais distantes fisicamente e de longa data, Fernanda, Rháris, Silvana, Guilherme e Liziane, que mesmo longe sempre estiveram me acompanhando em todos os momentos e transmitindo apoio e carinho.

Ao meu namorado Róger pelo apoio incondicional de sempre, paciência, amor e companheirismo.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao PPG-Bioquímica Toxicológica, colegas e professores, pelo apoio na realização deste trabalho e também a CAPES pela bolsa concedida.

“Duas estradas se bifurcam no meio da minha vida, ouvi um sábio dizer. Peguei a estrada menos usada. E isso fez toda a diferença cada noite e cada dia.” Larry Norman (pedindo desculpas a Robert Frost) - A Cabana.

## RESUMO

### DISCINESIA ESPONTÂNEA EM RATOS: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DE MECANISMOS OXIDATIVOS E DOPAMINÉRGICOS

AUTORA: Caroline Pilecco Barbosa  
ORIENTADORA: Roselei Fachinetto

A discinesia tardia é um distúrbio do movimento que se desenvolve em decorrência do uso prolongado de antipsicóticos, principalmente os típicos, em aproximadamente 20% a 25% dos pacientes e, com o aumento da idade, atinge cerca de 50% dos pacientes com mais de 55 anos de idade em tratamento com antipsicóticos típicos. Sabe-se que indivíduos que não fazem uso de antipsicóticos podem desenvolver distúrbios involuntários do movimento espontaneamente e estes também pioram com a idade. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar a possível participação de mecanismos oxidativos e/ou dopaminérgicos na discinesia espontânea em ratos. Para isso, foram utilizados ratos wistar machos com 40 semanas de idade e animais mais jovens, com 8 semanas de idade. Foram avaliados parâmetros comportamentais característicos de distúrbios involuntários do movimento que incluem os números de movimentos de mascar no vazio (MMVs), bem como a atividade locomotora e exploratória. O córtex, estriado e região contendo a substância negra foram utilizados para análise da atividade da enzima monoaminoxidase (MAO), a imunoreatividade da tirosina hidroxilase (TH) e marcadores relacionados ao estresse oxidativo. Foi observado que os ratos adultos (40-42 semanas de idade) apresentaram um aumento dos MMVs em torno de 60% em relação aos ratos mais jovens (8-10 semanas de idade), no entanto, havia um percentual de ratos adultos com diferentes valores de MMV e então os resultados foram divididos nos que apresentaram baixos e altos valores de MMV. Não houve diferença significativa tanto na atividade locomotora como na exploratória dos ratos entre os grupos. Houve um aumento de aproximadamente 13% na atividade da enzima MAO-B no estriado e córtex, assim como também foi observada redução de aproximadamente 30% na imunoreatividade da enzima TH no estriado, sendo todas as alterações relacionadas ao fator idade. Somente a alteração da atividade da MAO-B no estriado esteve relacionada ao número de MMVs. Da mesma forma, foram observadas alterações na oxidação da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), atividade da catalase, conteúdo de tiol proteico e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas diferentes estruturas cerebrais, porém todas relacionadas à idade. Apenas a oxidação da DCFH-DA e a atividade da catalase apresentaram-se alteradas relacionadas ao número de MMVs. Sendo assim, a maioria das alterações nos marcadores bioquímicos no cérebro de ratos foram associadas à idade dos animais. A presença de MMV espontâneos em ratos adultos foi associada a alterações na atividade da MAO-B no estriado e da oxidação DCFH-DA no córtex e na substância negra. Podemos concluir que, assim como acontece em modelos animais com uso de antipsicóticos, a idade pode contribuir para a manutenção dos movimentos involuntários também naqueles animais que não fazem uso desses fármacos.

**Palavras-chave:** Sistema Dopaminérgico. Envelhecimento. Estresse oxidativo. Monoaminoxidase.

## ABSTRACT

### SPONTANEOUS DYSKINESIA IN RATS: POSSIBLE PARTICIPATION OF OXIDATIVE AND DOPAMINERGIC MECHANISMS

AUTHOR: CAROLINE PILECCO BARBOSA  
ADVISOR: ROSELEI FACHINETTO

Tardive dyskinesia is a movement disorder that develops as a result of prolonged use of antipsychotics, mainly the typical ones, in approximately 20% to 25% of patients and, as age increases, it afflicts about 50% of patients with over 55 years old on typical antipsychotic treatment. It is known that individuals who do not use antipsychotics may develop involuntary movement disorders spontaneously and these worsen with age as well. Therefore, this study aimed to investigate a possible participation of oxidative and/or dopaminergic mechanisms of spontaneous dyskinesia in rats. To do so, experiments with male Wistar rats at 40 weeks of age and younger animals at 8 weeks of age. Behavioral characteristics of involuntary movement disorders, which are the numbers of vacuous chewing movements, as well as an exploratory and locomotor activity were evaluated. The cortex, striatum and region containing the substantia nigra were used for the analysis of the activity of the enzyme monoaminoxidase (MAO), the immunoreactivity of the tyrosine hydroxylase (TH) and markers related to oxidative stress. It was observed that adult rats (40-42 weeks of age) had an increase of VCM around of 60% than younger rats (8-10 weeks of age), however, there was a percentage of adult rats with different VCM values and then the results were divided in those that presented low and high values of VCM. There was no significant difference in both the locomotor and exploratory activity of the rats in all groups. There was an increase about 13% in the activity of the MAO-B enzyme in the striatum and cortex, as well as a decrease about 30% in the immunoreactivity of the TH in the striatum, considering that all alterations were related to age. Only the alteration of the MAO-B activity in striatum was related to the number of VCMs. Likewise, alterations in the oxidation of the dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), catalase activity, proteic thiol content and substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) in different brain structures, though all related to age. Only the oxidation of the DCFH-DA and the catalase activity were altered in relation to the number of VCMs. Hence, most of the alterations in the biochemical markers in rat brains were associated to the age of the animals. The presence of spontaneous VCM in adult rats was associated to alterations in the MAO-B activity in the striatum and DCFH-DA oxidation in the cortex and substantia nigra. It can be concluded that, as in animal models with the use of antipsychotics, age may contribute to the maintenance of involuntary movements also in animals that do not use these drugs.

**Keywords:** Dopaminergic System. Aging. Oxidative stress. Monoamine oxidase.



## LISTA DE ABREVIATURAS

DA	– Dopamina
DCFH-DA	– Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato
DE	– Discinesia espontânea
DO	– Discinesia orofacial
DT	– Discinesia tardia
ERN	– Espécies reativas de nitrogênio
ERO	– Espécies reativas de oxigênio
GABA	– Ácido gama-aminobutírico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– Peróxido de Hidrogênio
MAO	– Monoaminoxidase
MMV	– Movimentos de mascar no vazio
NMDA	– N-metil-D-aspartato
SNC	– Sistema nervoso central
TDA	– Transportador de dopamina
TH	– Tirosina hidroxilase
TVMA2	– Transportador vesicular de monoaminas 2

## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1	SISTEMA DOPAMINÉRGICO .....	13
2.2	DISCINESIA TARDIA .....	14
<b>2.2.1</b>	<b>Hipóteses para o desenvolvimento da DT</b> .....	14
2.2.1.1	<i>Hipótese da Supersensibilidade dopaminérgica</i> .....	15
2.2.1.2	<i>Hipótese GABAérgica</i> .....	15
2.2.1.3	<i>Hipótese glutamatérgica</i> .....	16
2.2.1.4	<i>Hipótese do estresse oxidativo</i> .....	16
2.3	DISCINESIA ESPONTÂNEA .....	17
2.4	PREVALÊNCIA DA DISCINESIA OROFACIAL EM MODELOS ANIMAIS .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
3.1	OBJETIVO GERAL .....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	21
4.1	MANUSCRITO SPONTANEOUS DYSKINESIA IS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE AND DOPAMINERGIC ALTERATIONS .....	22
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	46
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
	<b>ANEXO</b> .....	54
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMENTROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS COM DISCINESIA ESPONTÂNEA</b> .....	55

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação será apresentada na forma de um manuscrito científico. No item **INTRODUÇÃO e REFERENCIAL TEÓRICO**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas abordados nesta dissertação.

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS**, **RESULTADOS**, **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS** e **REFERÊNCIAS**, encontram-se no item **MANUSCRITO**, o qual representa a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÕES** encontrado no final desta dissertação, apresenta conclusões relativas aos dados encontrados neste estudo.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO e REFERENCIAL TEÓRICO**.

## 1 INTRODUÇÃO

A discinesia manifesta-se através da presença de movimentos involuntários anormais, repetitivos, persistentes e estereotípias normalmente dos músculos faciais, mas também pode envolver outros grupos musculares, incluindo as extremidades e o tronco (MERRILL et al., 2013; MAHMOUDI et al., 2014). Esses movimentos involuntários são de maior prevalência em pacientes recebendo tratamento crônico com fármacos antipsicóticos, sendo desta forma denominada discinesia tardia (DT) (LOONEN; IVANOVA, 2013; MERRILL et al., 2013). Entretanto, a discinesia ocorre também em pessoas que não fazem uso de fármacos, ou ainda que apresentem esquizofrenia sem estar em tratamento farmacológico, bem como em pacientes que possam ter algum fator de risco, como idade avançada e danos cerebrais, sendo chamado discinesia espontânea (DE) (BLANCHET et al., 2004; MACALUSO, 2017).

A patofisiologia da DT é ainda pouco compreendida, e as hipóteses que tentam explicá-la não se sustentam quando intervenções farmacológicas são testadas como possível tratamento, sendo consenso para a maioria dos autores a participação do sistema dopaminérgico (CASEY, 2000; CORNETT et al., 2017). A dopamina, um neurotransmissor pertencente à classe das catecolaminas, atua principalmente no controle dos movimentos, memória e sensação de prazer (MARSDEN, 2006). É sintetizada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante na biossíntese de catecolaminas, a qual catalisa a conversão da L-Tirosina em L-DOPA, essa que será posteriormente descarboxilada em dopamina, sendo, portanto de importância a avaliação desta enzima como marcador da biossíntese de dopamina e de dano neuronal (LIMA et al., 2012). Já o transportador de dopamina tem um papel importante em distúrbios que alteram a plasticidade neuronal dopaminérgica, desde que este transportador é a principal via para a captação da dopamina extracelular e para regulação da magnitude e duração da sinalização dopaminérgica (KAHLIG; GALLI, 2003). Assim, alterações nestes marcadores podem influenciar a homeostase da dopamina e a vulnerabilidade a diversas substâncias tóxicas.

De particular importância, dados do nosso grupo demonstraram que há uma relação entre os movimentos de mascar no vazio (MMV) e a redução da atividade da enzima monoaminoxidase (MAO) em camundongos tratados com reserpina (DE FREITAS et al., 2016) e em ratos tratados com flufenazina (BUSANELLO et al., 2017). A MAO é a enzima responsável pela desaminação oxidativa de diversas aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (SOTO-OTERO et al., 2001), a qual forma como produto de oxidação o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio (FISAR, 2016). Devido à sua função no metabolismo das catecolaminas, a MAO

parece exercer um papel importante na patofisiologia de diversos distúrbios neurológicos e psiquiátricos (YOUDEM; BAKHLE, 2006).

Em animais também é visto um aumento da discinesia orofacial com o aumento da idade tanto induzida por antipsicóticos quanto espontânea (ANDREASEN; JORGENSEN, 2000; HARVEY; NEL, 2003; BURGER et al., 2004). Dados da literatura demonstram que em animais experimentais, a discinesia espontânea possui uma prevalência em torno de 20% (WADDINGTON et al., 1982; KANE; SMITH, 1982; WOERNER et al., 1991), a qual é caracterizada pelos distúrbios do movimento sem qualquer administração de fármacos, sendo semelhante à discinesia induzida por fármacos.

Sabendo, portanto, que pacientes com alterações no sistema dopaminérgico apresentam discinesias espontâneas, levando em consideração também que alguns trabalhos demonstram que a supersensibilidade dopaminérgica ocorre em pacientes que não apresentam discinesia, acredita-se que o mesmo possa ser observado também em animais que apresentem discinesia espontânea, sem administração desses fármacos, possibilitando o estudo dos mecanismos envolvidos na discinesia espontânea a fim de facilitar a busca por estratégias terapêuticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A discinesia é uma alteração motora caracterizada por movimentos anormais da região orofacial, tronco e membros. Pode aparecer espontaneamente ou após o uso de determinados fármacos, tais como antipsicóticos ou metoclopramida (BLANCHET, 2003; MAHMOUDI et al., 2014). Um sistema que está envolvido no controle de movimentos e também é local de ação para os fármacos que são efetivos no tratamento da esquizofrenia é o sistema dopaminérgico.

### 2.1 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

O neurotransmissor dopamina (DA), uma catecolamina, é sintetizado por ação da TH no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos. Após a síntese, a DA é transportada pelo transportador vesicular de monoaminas 2 (TVMA2), para vesículas pré-sinápticas onde ocorre o armazenamento para posterior liberação (WEIHE et al., 1996; EIDEN et al., 2004). Após a liberação da DA na fenda sináptica, ela pode se ligar à receptores dopaminérgicos e também ser reciclada para vesículas pré-sinápticas, onde a recaptação é realizada pelo transportador de dopamina (TDA) e seguido pelo sequestro e armazenamento nas vesículas sinápticas pelo TVMA2 (WEIHE et al., 1996). A DA acumulada no citosol ou que permanece na fenda sináptica pode ser metabolizada pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) ou catecol-O-metil-transferase (COMT) (ERIKSEN et al., 2010; MEISER et al., 2013).

A enzima MAO é responsável pela desaminação de diversas aminas biogênicas, entre elas a dopamina, serotonina e noradrenalina (SOTO-OTERO et al., 2001). A MAO apresenta-se sob duas isoformas: a MAO-A e a MAO-B (JOHNSTON, 1968; BACH et al., 1988). A MAO-A é expressa tanto no cérebro quanto na periferia, já a MAO-B se concentra no sistema nervoso central (SNC). Em humanos, ambas as isoformas podem degradar uma variedade de compostos monoamínicos, no entanto a MAO-B é responsável pela desaminação da maior parte da dopamina do SNC, enquanto que a MAO-A possui uma seletividade maior em desaminar serotonina (YOUDIM et al., 2006). Já em roedores a MAO-A é responsável pela desaminação da maior parte da dopamina do SNC (NAPOLITANO et al., 1995).

Devido à sua ação no metabolismo das catecolaminas, a MAO parece exercer um papel importante na fisiologia de diversas enfermidades neurológicas e psiquiátricas (YOUDIM; BAKHLE, 2006).

## 2.2 DISCINESIA TARDIA

A discinesia pode ser classificada como DT quando provocado pelo uso crônico de antipsicóticos típicos utilizados no tratamento da esquizofrenia, tais como Haloperidol e Flufenazina, desenvolvendo-se após meses ou anos de seu uso contínuo (LOONEN; IVANOVA, 2013; MERRILL et al., 2013).

A esquizofrenia afeta o modo como uma pessoa pensa, sente e se comporta. Caracteriza-se por apresentar sintomas positivos (alucinações e delírios) e sintomas negativos (retraimento social) (WADDINGTON et al., 2012; HOWES; MURRAY, 2014). A patofisiologia da esquizofrenia tem sido atribuída a um desequilíbrio na atividade dopaminérgica no SNC, levando à hiperatividade dopaminérgica da via mesolímbica. Desta forma, os fármacos antipsicóticos, tanto típicos quanto atípicos, são o tratamento de escolha para a esquizofrenia os quais possuem como mecanismo de ação o bloqueio de receptores dopaminérgicos na via mesolímbica (MARSDEN; JENNER, 1980; MARSDEN, 2006; TEO et al., 2012).

Os antipsicóticos típicos foram os primeiros a serem descobertos e ainda hoje são mais largamente utilizados para o tratamento da esquizofrenia, no entanto seu uso prolongado provoca efeitos adversos, como a DT (KANE; SMITH, 1982; MILLER; CHOUINARD, 1993; ANDREASSEN; JORGENSEN, 2000; CHOUINARD et al., 2017). Os antipsicóticos atípicos, como por exemplo, Olanzapina e Risperidona, diferem dos antipsicóticos típicos por apresentarem menor incidência de efeitos extrapiramidais, como a DT, no entanto levam a ganho de peso e diabetes tipo 2 (MELTZER, 2004; MARCHESE, 2004).

Dados da literatura demonstram que a DT possui uma prevalência em torno de 20-25% em pacientes em tratamento com antipsicóticos (LEE et al., 2014), e que aumenta com a idade. De fato, a idade é considerada um dos fatores de risco para o desenvolvimento da DT, tendo em vista que atinge cerca de 50% dos pacientes com mais de 55 anos de idade em tratamento com antipsicóticos típicos (WOERNER, 1998; HARVEY; NEL, 2003).

### 2.2.1 Hipóteses para o desenvolvimento da DT

Os mecanismos que levam a fisiopatologia da DT após o uso crônico de antipsicóticos permanecem incertos. Algumas hipóteses tentam explicá-la, as quais incluem a supersensibilidade dopaminérgica (SEEMAN; SEEMAN, 2013), alterações na neurotransmissão GABAérgica (PRATT et al., 2012), a hipofunção de receptores de glutamato NMDA (OLNEY; FARBER, 1995; GOFF; COYLE, 2001) e o aumento no estresse oxidativo (BOŠKOVIĆ et al., 2011).

### 2.2.1.1 Hipótese da Supersensibilidade dopaminérgica

A hipótese mais amplamente descrita para a DT é a da supersensibilidade dopaminérgica, na qual o bloqueio crônico e substancial do receptor D2 na via nigroestriatal provocaria um aumento compensatório na síntese do receptor D2 (geralmente referido como upregulation), o que, por sua vez, leva a uma supersensibilidade nesta via dopaminérgica (MARCOTTE et al., 2001; STEEDS et al., 2014).

Como a via nigroestriatal está relacionada ao controle dos movimentos, a supersensibilidade dos receptores D2 nesta via levaria às alterações anormais dos movimentos da DT (OBESO et al., 2008; SMITH; VILLALBA, 2008). Esta teoria foi descrita pela primeira vez em animais, onde existem evidências diretas da hipersensibilidade ao receptor D2 induzidos por haloperidol, onde foi observado aumento na sensibilidade do receptor (ROGUE et al., 1991; CALABRESI et al., 1992; TURRONE et al., 2003).

Alguns estudos demonstram que também ocorrem alterações em outros marcadores dopaminérgicos, tais como a enzima limitante da síntese de dopamina TH (DAUBNER et al., 2011), a captação de dopamina (FACHINETTO et al., 2007) e níveis do TDA (YODER et al., 2004; KACPRZAK et al., 2017) tanto em pacientes como em animais experimentais, ressaltando a importância do sistema dopaminérgico no desenvolvimento da DT.

### 2.2.1.2 Hipótese GABAérgica

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal aminoácido inibitório, promovendo influxo de íons  $\text{Cl}^-$  e, conseqüente fechamento de canais de  $\text{Ca}^{++}$ , resultando na hiperpolarização da membrana do neurônio (CHEBIB; JOHNSTON, 1999).

A hipótese GABAérgica é descrita por outros autores que sugerem que uma subpopulação de neurônios GABAérgicos do estriado estariam danificados ou disfuncionais em pessoas em tratamento prolongado com antipsicóticos e que desenvolveram DT (TAMMIGA et al., 2002; TAYOSHI et al., 2009), o que acarretaria em diminuição de GABA na região da *substantia nigra pars compacta* e na supersensibilidade dos seus respectivos receptores (COWARD, 1982; THAKER et al., 1987).

Na última década, o microcircuito complexo dos interneurônios estriados GABAérgicos foi descrito e delineado em detalhe (MALLET et al., 2005; GITTIS et al., 2010; BORDIA et al., 2016). No entanto, clinicamente, intervenções farmacológicas com agonistas GABA não têm apresentado resultado satisfatório no tratamento da DT (CASTRO et al., 2006).



### 2.2.1.3 Hipótese glutamatérgica

O glutamato é o principal aminoácido excitatório, onde este induzirá o fechamento dos canais de  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{K}^+$ , diminuindo o influxo ou o efluxo desses íons, devido à abertura de canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , despolarizando a membrana neuronal (MELDRUM, 2000).

Alterações no sistema glutamatérgico estão envolvidas em diversas doenças neurológicas, entre elas a esquizofrenia, onde sugere-se ocorrer diminuição de glutamato no SNC, devido a uma possível hipofunção dos seu respectivo receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Essa hipótese baseia-se na relação dos efeitos psicogênicos da fenciclidina, uma droga psicoativa antigamente usada como anestésico e que é antagonista não competitivo dos receptores NMDA (LODGE; ANIS, 1982; NAKAZAWA et al., 2012).

Estudos demonstram que há indícios da participação de um componente glutamatérgico no desenvolvimento da DT induzido por reserpina (DUTRA et al., 2002; RAGHAVENDRA et al., 2001). Dados da literatura demonstraram que há uma relação negativa entre o transporte de glutamato e a manifestação da DO em ratos expostos de forma aguda a reserpina ou repetidamente ao haloperidol (BURGER et al., 2005) e, também o transportador de glutamato contém grupos tiol reativos na sua estrutura que resulta na captação do glutamato e, por consequência, agentes oxidantes podem produzir neurotoxicidade aumentando o glutamato extracelular (TROTTI et al., 1999).

### 2.2.1.4 Hipótese do estresse oxidativo

Espécies reativas de Oxigênio (ERO) são geradas de forma fisiológica devido ao metabolismo aeróbico. Entre as EROs destaca-se o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (HALLIWELL, 2011). Além das ERO, são também geradas espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico (FREI, 1994; FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2011). Em condições normais as ERO/ERN são detoxificadas pelo sistema de defesa antioxidante, composto pelos antioxidantes enzimáticos (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) e os antioxidantes não-enzimáticos (Vitaminas A, C e E e glutathione) (NORDBERG; ARNER, 2001; KOHEN; NYSKA, 2002).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e o sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL, 2011). Com isso, um excesso de ERO/ERN pode reagir com ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas das células, dano esse conhecido como peroxidação lipídica, o qual provoca alteração na permeabilidade, acarretando

a ruptura e lise celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Este desequilíbrio geralmente acontece durante o envelhecimento, em algumas patologias ou também como uma consequência de inúmeras doenças (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013).

Já é de conhecimento prévio que o cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, principalmente pela grande quantidade de oxigênio utilizada e também por ser um local extremamente rico em ácidos graxos poli-insaturados, o que propicia a peroxidação lipídica (LOHR, 1991; LOHR et al., 2003).

De particular importância para este estudo, uma das hipóteses que tenta explicar o desenvolvimento da discinesia é a de que, poderiam estar ocorrendo alterações nos níveis e, conseqüentemente no metabolismo da dopamina em vias dopaminérgicas em pacientes acometidos por este distúrbio motor (MARSDEN, 2006). Sabe-se que um aumento na atividade das oxidases, como é o caso da MAO, leva a geração de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FISAR, 2016). Além disso, a dopamina pode sofrer auto-oxidação formando quinona de dopamina que age como uma espécie reativa de oxigênio (LOHR, 1991; LOHR et al., 2003).

Neste contexto, dados da literatura têm demonstrado que, em animais tratados com antipsicóticos, existe aumento nos níveis de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas, redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, e também redução da glutathione reduzida e conseqüente aumento da glutathione oxidada (ABÍLIO et al., 2004; FARIA et al., 2005; SADAN et al., 2005; PILLAI et al., 2007; CHO; LEE, 2013). Além disso, substâncias antioxidantes tem apresentado efeito protetor sobre o desenvolvimento da discinesia induzida por fármacos (RECKZIEGEL et al., 2013; WANG et al., 2015; BUSANELLO et al., 2017; AN et al., 2017).

### 2.3 DISCINESIA ESPONTÂNEA

A DE manifesta-se por movimentos involuntários principalmente dos músculos da face. No entanto por ser espontânea, pode acometer pessoas que não fazem uso de fármacos, ou ainda que apresentem esquizofrenia sem estar em tratamento farmacológico, bem como em pacientes que possam ter algum fator de risco, como idade avançada e danos cerebrais (BLANCHET et al., 2004; MACALUSO, 2017). Em 1980, estudos da Associação Americana de Psiquiatria concluíram que os fatores de risco para a DT incluíam o uso de antipsicóticos seletivos D2, como haloperidol, bem como o uso concomitante de agentes anticolinérgicos (MACALUSO, 2017). O sexo do paciente (em mulheres a dose administrada pode ser alta se não for levado em

consideração o peso corporal), idade e histórico de danos cerebrais também são fatores de risco aumentados para DT. No entanto, esses mesmos fatores de risco são também semelhantes para o desenvolvimento de DE tais como idade, danos cerebrais e também pacientes com esquizofrenia e que ainda não estejam sob tratamento (MACALUSO, 2017).

A prevalência de DE em indivíduos saudáveis fica em torno de 2% na faixa etária inferior a 40 anos, 11% em indivíduos entre 40 e 49 anos, 26% entre 50 e 59 anos (BARNES et al., 1983). De fato a idade é um fator relevante para o desenvolvimento tanto da DE como da DT, tendo em vista que uma metanálise revelou que pacientes com mais de 60 anos apresentam uma prevalência de desenvolver DE em torno de 40% (FENTON, 2000).

No entanto, apesar de diversos autores relatarem a ocorrência de DE em animais experimentais, e com comprovado aumento desta em relação à idade (HARVEY; NEL, 2003; BURGER et al., 2004; FACHINETTO et al., 2005, 2007a,b), estudos acerca de seus mecanismos são escassos.

#### 2.4 PREVALÊNCIA DA DISCINESIA OROFACIAL EM MODELOS ANIMAIS

Em modelos animais, a DT é chamada DO, também caracterizada por movimentos orais não direcionados a nenhum objeto, protruções de língua e tremores faciais (TURRONE et al., 2002; ANDREASEN et al., 2001; ANDREASEN et al., 2002). Dentre os modelos animais de DO destacam-se os modelos agudos e crônicos induzidos por antipsicóticos e o modelo de DO induzido por reserpina (EGAN et al., 1996; QUEIROZ; FRUSSA-FILHO, 1999).

Em animais também é visto um aumento da DO com o aumento da idade tanto induzida por antipsicóticos quanto espontânea (ANDREASEN; JORGENSEN, 2000; HARVEY; NEL, 2003; BURGER et al., 2004). Dados da literatura demonstram que em animais experimentais, a discinesia espontânea possui uma prevalência em torno de 20% (WADDINGTON et al., 1982; KANE; SMITH, 1982; WOERNER et al., 1991), a qual é caracterizada pelos distúrbios do movimento sem qualquer administração de fármacos, sendo semelhante à discinesia induzida por fármacos.

A maioria dos dados relatados na literatura apresenta proporções de animais com altos escores de movimentos orofaciais entre 30-50% dependendo do antipsicótico utilizado ou da via de administração (BLANCHET et al., 2012). Um estudo demonstrou ainda que esta síndrome de discinesia orofacial espontânea persistiu nos animais após o término do tratamento com antipsicóticos e ainda aumentou a prevalência com o passar do tempo nos animais controles (WADDINGTON et al., 1982).

Desta forma, em nosso grupo, animais que apresentam DE são excluídos dos experimentos para que não gerem resultados falsos positivos (FACHINETTO et al., 2005, 2007a,b; BUSANELLO et al., 2012).

No modelo animal de DO induzido por reserpina, um inibidor do TVMA, foi observado que há uma relação entre os MMV e a redução da atividade da enzima MAO em camundongos tratados com esta droga (DE FREITAS et al., 2016). O mesmo foi observado em ratos no modelo de DO induzido por flufenazina, um antipsicótico típico (BUSANELLO et al., 2017). Outro trabalho mostra que o modelo de flufenazina, também em ratos, aumentou atividade da catalase e a oxidação da diclorofluoresceína (DCFH-DA) na região do córtex (SCHAFFER et al., 2016).

Assim, uma vez que a DT é altamente prevalente em pacientes que tomam antipsicóticos e é ainda maior em pacientes idosos, bem como a presença da DE em pacientes idosos que não usam fármacos, o presente estudo propõe investigar se os mecanismos oxidativos e monoaminérgicos estão relacionados à DE em ratos adultos ou se as possíveis alterações nesses parâmetros apenas estão relacionadas com a idade, comparando jovens com animais adultos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a possível participação de mecanismos oxidativos e/ou dopaminérgicos na discinesia espontânea em ratos

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar parâmetros comportamentais de discinesia e de locomoção em ratos jovens adultos e adultos maduros;
- Quantificar a atividade da enzima monoaminoxidase e a imunorreatividade da enzima tirosina hidroxilase em ratos jovens adultos e adultos maduros;
- Investigar parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos jovens adultos e adultos maduros.

## 4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se no próprio manuscrito. O próprio **manuscrito** está disposto na forma como será submetido para publicação na revista *Behavioural Brain Research*.

## 4.1 MANUSCRITO

SPONTANEOUS DYSKINESIA IS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE AND  
DOPAMINERGIC ALTERATIONS

Caroline Pilecco Barbosa<sup>a</sup>, Catiúscia Molz de Freitas<sup>a</sup>, Bárbara Nunes Krum<sup>a</sup>, Larissa Finger Schaffer<sup>b</sup>, Elizete de Moraes Reis<sup>b</sup>, Ana Paula Chiapinotto Ceretta<sup>b</sup>, Alcindo Busanello<sup>b</sup>, Getulio Nicola Bressan<sup>a</sup>, Caroline Queiroz Leal<sup>c</sup>, Roselei Fachinetto<sup>d</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, RS, Brazil.

**Corresponding author:**

Dra. Roselei Fachinetto

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: x21-55-3220 8096

Fax: x21-55-3220 8241

e-mail: roseleirf@gmail.com

## ABSTRACT

*Rationale:* Tardive dyskinesia is a movement disorder that develops as a result of the prolonged use of antipsychotics in approximately 20% to 25% of patients and has age as a risk factor. It is known that individuals who do not use antipsychotics may develop involuntary movement spontaneously and these become worse with age.

*Objective:* This study aimed to investigate if oxidative and monoaminergic mechanisms are related to spontaneous dyskinesia in adult rats or if the possible alterations in these parameters are only related with the age by comparing young adult with mature adult animals.

*Methods:* Male wistar rats at 40 weeks of age and younger animals at 8 weeks of age were used. Behavioral parameters characteristic of movement disorders that include numbers of vacuous chewing movements (VCM), as well as locomotor and exploratory activity, were evaluated. The cortex, striatum and region containing the substantia nigra and were used to analyze the activity of monoamine oxidase and parameters related to oxidative stress (DCFH-DA oxidation, catalase, proteic- and non proteic Thiol, and TBARS). Also, we evaluated the tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in striatum.

*Results:* It was observed that the adult rats presented a higher number of VCM than the younger rats at all evaluations. As there was a discrepancy of VCMs in the group of adult rats, they were divided in those that presented low and high values of VCM to evaluate the biochemical differences that could be related to VCM development or only with the age. We did not observe any alteration in the locomotor and exploratory activity of rats. Likewise, were found alterations in some oxidative stress markers in brain structures of rats with prevalent effect of age. Only to DCFA-DA oxidation, there was an increase in cortex and a decrease in substantia nigra of rats with high VCMs. Furthermore, an increase in the activity of the monoamine oxidase enzyme in cortex of adult animals and in striatum of adult animals presenting high VCM as well as a decrease in TH immunoreactivity of adult animals.

*Conclusions:* In conclusion, the majority of changes in biochemical markers in brain of rats were associated with the age of animals. A reduction in the immunoreactivity of TH was observed with respect to age, suggesting a possible neurodegeneration process since the decrease in TH immunoreactivity is attributed to a loss of neurons. The presence of spontaneous VCMs in adult rats was associated with alterations in MAO-B activity in striatum and DCFH-DA oxidation in cortex and substantia nigra.

**Keywords:** Dopaminergic System. Aging. Oxidative Stress. Monoamine oxidase.

### 1. INTRODUCTION

Dyskinesia manifests itself through the presence of abnormal, repetitive, persistent, involuntary movements and stereotypies usually of the facial muscles, but may also involve other muscle groups, including the extremities and trunk [1, 2]. These involuntary movements are of greater prevalence in patients receiving chronic treatment with classic antipsychotic drugs, being this denominated tardive dyskinesia (TD) [1, 3]. However,



they also affect people who do not use drugs, which are more common in the elderly, and is called spontaneous dyskinesia (SD) [4].

Some authors estimate that the main prevalence of TD in patients receiving classic antipsychotics is around 20-25% [5], and that it increases with age. In fact, age is considered one of the risk factors for TD, and reaches about 50% of the patients, over 55 years of age on antipsychotic treatment [6, 7]. In elderly patients who do not use any type of drug for neurological or psychiatric treatment, the SD index is approximately 2-5% in healthy patients less than 40 years old [4, 8], but in patients with more than 60 years old, this percentage can reach until 40% [9].

In animal models, tardive dyskinesia is called orofacial dyskinesia (OD) [10]. Among the animal models of OD, we highlight the acute models induced by antipsychotics and the reserpine-induced OD model [11, 12]. In animals, an increase in OD with both antipsychotic induced and spontaneously is seen with the increase of age [7, 13, 14]. According to literature, in experimental animals, SD had a prevalence of around 20% [15-17], which is characterized by movement disorders without any drug administration, being similar to drug induced OD. However, although several authors report the occurrence of SD and with a proven increase in age [7, 14, 18-20] there are few studies of its mechanisms about the possible mechanisms which leads to its development.

The pathophysiology of TD is still poorly understood, and the hypotheses that attempt to explain it are not supported when pharmacological interventions are tested as a possible treatment. However, it is common for most authors to participate in the dopaminergic system [21, 22]. In relation to the monoaminergic system, it is known that the tyrosine hydroxylase is a limiting enzyme in the catecholamine biosynthesis and catalyzes the conversion of L-tyrosine to L-DOPA, which will subsequently be decarboxylated in dopamine [23]. Thus being important the evaluation of this enzyme as a marker of dopamine biosynthesis.

Data from the literature show that the administration of antipsychotics by blocking dopaminergic receptors leads to a secondary increase in dopamine synthesis via tyrosine hydroxylase and elevation in the extracellular levels of this neurotransmitter and, consequently, to an increase in its metabolism via increased monoamine oxidase (MAO) activity [13, 24]. Due to its role in the metabolism of catecholamines, MAO seems to play an important role in the pathophysiology of various neurological and psychiatric disorders [25]. Within this context, it is known that an increase in MAO activity, due to the secondary increase in dopamine synthesis, can lead to the generation of reactive oxygen

species. In addition, dopamine can undergo auto-oxidation forming dopamine quinone that acts as a reactive oxygen species [24, 26].

Therefore, knowing that the reserpine and antipsychotic-induced OD can alter these biochemical markers [27-31], it is believed that it can also be observed in animals that present OD without drug administration allowing the study of the mechanisms involved in SD.

Thereby, since TD is highly prevalent in patients taking antipsychotics and is even higher in older patients, as well as the presence of SD in elderly patients who do not use drugs, the present study proposes to investigate if oxidative and monoaminergic mechanisms are related to spontaneous dyskinesia in adult rats or if the possible alterations in these parameters are only related with the age by comparing young adult with mature adult animals.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals**

Thirty eight male Wistar, adult rats (40 weeks of age) weighing 350-500g and young rats (8 weeks of age) weighing 200-300g were used. The animals were acquired from a breeding colony at UFSM and kept in cages (five animals). They were housed under standard laboratory conditions and maintained on a 12:12 h light–dark cycle with free access to food and water. Animals were acclimatized to laboratory conditions before the tests. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). This protocol was approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria under process number 7977261114/2015.

### **2.2 Experimental design**

In our group, we study orofacial dyskinesia induced by drugs [29, 30, 32, 33]. However, when an animal present high values of VCM at basal evaluation, this animal is normally excluded from the experiment to avoid misinterpretation of data [19, 20]. Thus, in the present study, we used the animals that were excluded from the other experiments for they had already shown high VCM without any administration of drugs.

To each animal excluded, we selected an animal the same age to be a -VCM control. The animals were maintained in standard conditions until they reach 40 weeks of age

since the age is a risk factor for dyskinesia [6, 7]. As a control group to age, ten male wistar rats were used, aging approximately 8 weeks old.

To avoid either false positive or negative results of VCMs, the animals were evaluated in three consecutive weeks (Young animals were evaluated with 8, 9 and 10 weeks of age and Adult animals with 40, 41 and 42 weeks of age). After, we did a mean of three evaluations and the animals with more than 35 VCMs were considered +VCMs [19, 20]. Thus, we conducted the other experiments with three groups: Young Adult (n=10), Mature Adult +VCMs (n=14) and Mature Adult -VCMs (n=14). The locomotor performance was also evaluated on weeks 8 and 10 to young animals; on weeks 40 and 42 to adult animals. After behavioral analysis, the rats were anesthetized with ketamine: xylazine (100:10 mg/kg, intraperitoneally) and euthanized by decapitation. The cortex, striatum and substantia nigra were immediately dissected and stored at -80°C for biochemical analysis.

## **2.3 BEHAVIORAL TEST**

### **2.3.1 Vacuous chewing movements (VCMs)**

Rats were placed individually in cages (20 cm × 20 cm × 19 cm) containing mirrors under the floor of the cage to allow behavioral quantification when the animal was faced away from the observer. To quantify the occurrence of orofacial dyskinesia, VCMs were defined as the single mouth openings in the vertical plane not directed towards physical material [34] and were measured continuously for 6 min after a period of 6 min of adaptation [18-20, 32]. After complete the behavioral tests, the group of the older animals was divided according to the VCMs quantification, where rats presenting VCMs more than 35 were included in the VCMs high VCM and VCMs smaller than 35 were included in low VCMs group.

### **2.3.2 Open field test**

To analyze changes in spontaneous locomotor and exploratory activities, the animals were placed individually in the center of an open-field arena (40 cm x 40 cm x 30 cm) divided into 9 equal parts, as previously described [35]. The number of line crossings (parameter related to locomotor activity) and number of rearing (parameter related to exploratory activity) were measured over 5 min.

## **2.4 BIOCHEMICAL ASSAYS**

### **2.4.1 Tissue preparation**

The cerebral structures (cortex, striatum and the region containing the substantia nigra) were dissected and homogenized in 10 volumes (w/v) of Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 and then centrifugated (3000 g for 10 min at 25°C) [36, 37]. The resulting supernatants were used in the biochemical assays described below.

### **2.4.2 Lipid peroxidation assay**

For measured lipid peroxidation, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were determined as described by Ohkawa [38]. Briefly, samples were incubated at 100°C for 1 h in a medium containing 8.1% sodium dodecyl sulphate, 1.4M acetic acid, pH 3.4 and 0.6% thiobarbituric acid. The chromogen was measured spectrophotometrically at 532 nm. The results were expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein.

### **2.4.3 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation**

The DCFH-DA assay was used to measure the DCFH-DA oxidation in the samples. The technique was performed as described by Pérez-Severiano et al [39]. The fluorescence of the samples was determined at 488 nm for excitation and 520 nm for emission. The result was defined as the difference between the fluorescence at 30 and 15 minutes of the reaction and expressed as DCFH-DA oxidation/mg protein.

### **2.4.4 Catalase activity**

To evaluate the activity of the enzyme catalase, the test was performed by adding an aliquot of the sample to the phosphate buffer (TFK 0.5 M pH 7.0). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition was monitored in a spectrophotometer at 240 nm to measure catalase activity by the method previously described by Aebi [40]. The enzymatic activity was expressed as  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}/\text{min}$ .

### **2.4.5 Thiol levels**

The content of thiol proteic and non-protein in the samples was determined as described by Ellman [41]. For the non-protein thiol groups, the samples were precipitated with 150  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The reaction was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results are expressed as  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  of protein.

### **2.4.6 Determination of MAO activity**

MAO activity was determined by measuring the kynuramine oxidation to 4-hydroxyquinoline [31, 42]. The samples were preincubated at 37 °C with the irreversible and selective inhibitor clorgyline (250 nM) or pargyline (250 nM) to assay MAO-A or MAO-B activity, respectively. After 20 min, kynuramine was added as a non-selective substrate. The reaction was incubated during 30 min at 37°C. In sequence, the reaction was stopped with trichloroacetic acid (TCA) 10%. The samples were centrifuged at 3.000 ×g for 8 min. It was added to supernatant 1M NaOH. The reaction was measured by fluorimetric method, using 315 nm (excitation) and 380 nm (emission). The results are represented as fluorescence intensity/mg protein.

#### **2.4.7 TH immunoreactivity**

The striatum was homogenized in 400 µL of lysis buffer (4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.5 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 2 µg/mL aprotinin, 0.1 mM benzamidine, 0.1 mM PMSF). Samples were boiled for 6 min and centrifuged at 8000 g at 4 °C for 10 min. The supernatant was used to determine protein concentration using the Lowry method. Then, the samples (40 µg) were mixed with 10 % glycerol and 8 % 2-mercaptoethanol and resolved by 10 % SDS-PAGE [29]. The samples were transferred into nitrocellulose membrane (Millipore, USA). Proteins on the membrane were stained with a Ponceau solution (0.5 % Ponceau plus 5 % glacial acetic acid in water), as a loading control [43]. After staining, the membranes were dried and scanned for quantification. Membranes were then processed using the SNAP ID system (Millipore, USA), blocked with 1 % bovine serum albumin, and incubated either with an anti-TH (1:1000; Millipore; AB152). The reaction was determined by a colorimetric assay using nitro blue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) as a substrate [44]. The membranes were dried, scanned, and quantified. Finally, all values were normalized using Ponceau quantification.

#### **2.4.8 Protein quantification**

The total protein content in supernatants homogenates was determined by the method of Lowry [45] using bovine serum albumin as standard.

## **2.5 Statistical analysis**

Data are presented as mean + SEM and were statistically analyzed by Unpaired t-Test or one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls test when appropriate. The results were considered statistically significant when  $p \leq 0.05$ .

## **3. RESULTS**

### **3.1 Influence of aged on incidence of VCMs in rats**

Firstly, to evaluate the influence of age, the VCMs were quantified for young adult and mature adult group (Fig. 1 A-C). The group of mature adult animals (41 and 42 weeks of age) presented higher VCMs compared with young adult animals (8-10 weeks of age) ( $p < 0.05$ ; Fig. 1A-C). In a second moment, the groups were divided after quantification of VCMs in young (10 weeks), the second group with rats of 42 weeks of age that presented low values of VCMs and another group of rats at 42 weeks of age but that presented values greater than 35 VCMs in 6 min (Fig.1 D-F). It is remarkable the increase of VCMs of the High VCM group in relation to the Low VCM and control groups and that remained the same in the three analyses ( $p < 0.05$ ; Fig. 1 D-F).

### **3.2 Influence of the age and of number of VCMs on the locomotor and exploratory activity in rats**

Any statistical difference was found on locomotor (Fig. 2A-D) and exploratory (Fig. 3A-D) activities either considering the age (Fig. 2A-B and Fig. 3A-B) or the presence of high VCMs (Fig. 2C-D and Fig. 3C-D).

### **3.3 Influence of the age and of number of VCM on MAO activity in rats**

In cortex, the age influenced in an increase in activity of MAO-B ( $p < 0.05$ ; Fig. 4B) without significant alterations in MAO-A (Fig. 4A) in adult rats. Accordingly, the MAO-B activity increased in both groups, low and high VCM ( $p < 0.05$ ; Fig. 4D), without alterations in MAO-A (Fig. 4C).

In striatum, there was an increase only on High VCM group to MAO-B activity ( $p < 0.05$ ; Fig. 5D), without significant differences among the groups in MAO-A activity related to VCM (Fig. 5C). With regard to the age, there were not differences between the groups in both MAO-A and MAO-B activity (Fig 5A and 5B).

In the region of the substantia nigra there were not significant differences among the groups neither in MAO-A (Fig. 6A and 6C) nor MAO-B (Fig. 6B and 6D) activity, both VCM-related and age-related (Fig. 6A-D).

### **3.4 Western Blot analysis of TH in the striatum**

To determinate if the TH had influence of VCM and age, knowing that pathophysiology of tardive dyskinesia is related with monoaminergic system, we examined the immunoreactivity of TH in the striatum. A significant decrease in TH immunoreactivity is observed in striatum of mature adult rats (Fig 7A and 7B).

### **3.5 Influence of the age and of number of VCM on oxidative stress parameters in rats**

In the cortex structure, in relation to age, the Adult group showed an increase on activity of catalase and oxidation of DCFH-DA with a significant reduction in the content of proteic thiol groups and production of TBARS ( $p < 0.05$ ; Table 1). The presence of high VCMs influenced of an increase in DCFA-DA oxidation and a decrease in TBARS production ( $p < 0.05$ ; Table 1). Furthermore, adults presenting low VCMs had an increase in catalase activity and a decrease in TBARS production ( $p < 0.05$ ; Table 1). No significant difference among the groups was observed in non-proteic thiol levels (Table 1).

In striatum, in relation to age, oxidation of DCFH-DA was significantly increased on mature adult group ( $p < 0.05$ ; Table 1), with any significance in other oxidative stress marker.

Accordingly, oxidation of DCFH-DA was significantly increased in both Low and High VCM group ( $p < 0.05$ ; Table 1).

In the region containing the substantia nigra, the oxidation of DCFH-DA was decreased on mature adult group and also in animals presenting High VCMs ( $p < 0.05$ ; Table 1). The levels of TBARS were increased while the catalase activity decreased in adult animals ( $p < 0.05$ ; Table 1) with any alteration related to the presence of VCMs (Table 1).

No significant difference was observed in TBARS and Thiol levels in the groups (Table 1).

## **4. DISCUSSION**

In the present study, we investigated the relation between aging and the manifestation of dyskinesia without drug administration. In humans, SD is observed with aging and because risk factors like schizophrenia untreated and neuronal damage [4, 8]. In animals, this is also observed, since a percentage of the rodents present SD [15-17] and this increases with age.

We first observed that adult mature rats had higher VCM values compared to younger animals. An increase in MAO-B activity was observed in the cortex region in adult mature rats which was related with the age. In the striatum, an increase in MAO-B activity was observed only in the High VCM group. A significant decrease in the immunoreactivity of TH was observed in the striatum of adult rats. With regard to oxidative stress, in the cortex the group of adult rats showed an increase in catalase activity and oxidation of DCFH-DA with a significant reduction in the content of proteic thiol groups and in the production of TBARS. In the striatum, the oxidation of DCFH-DA was significantly increased in adult mature rats and also both groups with low and High VCM.

The motivation of this study was the observation that some animals present SD, which are normally excluded in basal behavioral evaluation from our experiments since they could generate false results in experiments using drugs as inducers of OD [18-20, 31, 32]. Thus, it was separated the animals presenting high VCMs with a correspondent animal presenting low VCM at same age to allow investigate the differences between animals presenting or not High VCMs. The animals were maintaining until they complete 40 weeks of age since the age is a risk factor of dyskinesia [7, 13, 14] either induced by drugs or spontaneous. Then, it was performed three sections of behavioral analysis of VCMs to guarantee that animals will be correctly divided into High and Low VCMs. At this time, it was included a group of young animals with 8 weeks of age to allow investigate if the possible alterations founded were also related to the age. It was observed a significant increase of number of VCM on adult group compared with young animals reinforcing the idea that the age is a risk factor for movement disorders even in animals untreated with any drug. After this confirmation, the adult group was divided in High and Low VCM to allow the investigation of some possible mechanisms involved in this behavioral manifestation.

According to the literature, there is a decrease on locomotor activity when antagonists of dopamine receptors are administrated [30, 36, 46]. In the present study, it was not observed significant alterations on locomotor and exploratory activity when adult rats



were evaluated on open field tests either considering the age or VCMs as a factor. In previous studies of our group using dopaminergic agents, it was also observed the substances able to prevent VCMs not necessarily avoid the locomotor damage caused by these drugs [32, 47] suggesting the pathways involved in the control of orofacial involuntary movements could be distinct from that related to locomotor and exploratory activities [36, 37]. As literature data have showed the involvement of MAO in neurodegenerative [48, 49] and apoptotic process [50] and that TH is an enzyme responsible by catecholamine synthesis [51] and its reduction is related to neuronal loss [52], it was investigated the activity of MAO-A and MAO-B and the immunoreactivity of TH in brain structures of rats related to movement control.

In the cortex region, it was observed a significant increase of MAO-B activity in the group related to age and we believe that MAO-B is metabolizing a greater amount of monoamines, causing a reduction in the monoamines available in the synaptic cleft which may be involved with motor alterations, taking into account that the cortex is also a region involved with movement control. (Fig 4 B, D).

In striatum it was observed a significant increase of MAO-B activity only on High VCM group (Fig.5 D). This data is in accordance with previous report from literature, considering that the striatum is a structure that takes a part of basal ganglia and is involved in the involuntary movement control. We believe this occurred because just as when there is the drug administration and TD manifestation, the appearance of the SD could be related to an alteration on dopamine signaling pathways [24, 26, 53, 54].

As we found alterations in MAO-B activity related with the presence of VCMs, we decided to investigate if TH (a key enzyme to monoamine synthesis) could be altered either by age or VCM development in rats. There was a significant reduction TH immunoreactivity in the striatum of animals with 42 weeks of age without relation with the presence of VCMs. This data suggest a possible neurodegeneration process since the decrease in TH immunoreactivity is attributed to a loss of neurons [52, 54].

Another hypothesis to involuntary movements which appears with the age is the alteration in oxidative stress [24, 26]. Then, it was investigated the possible alterations in oxidative stress markers (DCFH-DA oxidation and TBARS production), enzymatic (catalase) and non-enzymatic defenses (proteic and non-proteic thiol groups).

In cortex region, as was seen in previous studies of our own group using a classical antipsychotic [30], here it was shown a significant increase both of DCFH-DA oxidation and in catalase activity on both age and related to VCM adult groups (Table 1). It is known

the MAO-catalyzed reaction also generates aldehyde, ammonia, and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) [55]. Not only the mitochondrial oxidative phosphorylation system, but also the activity of MAO is one of the sources of  $H_2O_2$  in the brain [56]. Therefore, MAO contributes to the production of ROS and participates in oxidative stress in the brain [55, 56]. Corroborating this hypothesis, it was found an increase in MAO-B activity in cortex and striatum that would be involved with the increase of catalase activity and DCFH-DA oxidation.

A significant reduction in the content of proteic thiol groups and production of TBARS was also observed. Mature adult animals presenting low VCM had an increase in catalase activity and a decrease in TBARS production.

In striatum, it was observed that there was a significantly increase of DCFH-DA oxidation, on Table 1 according to the age, also was observed the increase in both adult groups related to VCM, also corroborating with the hypothesis that an increase of MAO activity, also observed in this structure, could be increase the production of  $H_2O_2$ .

In region containing the substantia nigra, a decrease of DCFH-DA oxidation according to age and also on High VCM (Table 1). The levels of TBARS were increase while the catalase activity decrease in adult animals. These data suggest that the main changes of oxidative stress markers and antioxidant defenses are related to the age of rats being only changes in catalase activity and DCFH-DA oxidation related to the presence of High or Low VCMs.

In conclusion, the present study demonstrated that there is an aging influence on increase of spontaneous dyskinesia. Furthermore, changes in almost all mechanisms investigated are influenced by age being the presence of High VCMs in these animals related to alterations in MAO-B, catalase activity and DCFH-DA oxidation. However more studies are necessary to elucidate the mechanism of the spontaneous involuntary movements as well as possible therapeutics strategies.

#### **4 REFERENCES:**

- [1] R.M. Merrill, J.L. Lyon, P.M. Maticco, Tardive and spontaneous dyskinesia incidence in the general population, *BMC psychiatry* 13 (2013) 152.
- [2] S. Mahmoudi, D. Levesque, P.J. Blanchet, Upregulation of dopamine D3, not D2, receptors correlates with tardive dyskinesia in a primate model, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29(9) (2014) 1125-33.
- [3] A.J. Loonen, S.A. Ivanova, New insights into the mechanism of drug-induced dyskinesia, *CNS spectrums* 18(1) (2013) 15-20.

- [4] P.J. Blanchet, O. Abdillahi, C. Beauvais, P.H. Rompre, G.J. Lavigne, Prevalence of spontaneous oral dyskinesia in the elderly: a reappraisal, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19(8) (2004) 892-6.
- [5] M.J. Lee, P.Y. Lin, Y.Y. Chang, M.Y. Chong, Y. Lee, Antipsychotics-induced tardive syndrome: a retrospective epidemiological study, *Clinical neuropharmacology* 37(4) (2014) 111-5.
- [6] M.G. Woerner, J.M. Alvir, B.L. Saltz, J.A. Lieberman, J.M. Kane, Prospective study of tardive dyskinesia in the elderly: rates and risk factors, *The American journal of psychiatry* 155(11) (1998) 1521-8.
- [7] B.H. Harvey, A. Nel, Role of aging and striatal nitric oxide synthase activity in an animal model of tardive dyskinesia, *Brain research bulletin* 61(4) (2003) 407-16.
- [8] M. Macaluso, A. Flynn, S.H. Preskorn, Tardive Dyskinesia: A Historical Perspective, *Journal of psychiatric practice* 23(2) (2017) 121-129.
- [9] T.R. Barnes, M. Rossor, T. Trauer, A comparison of purposeless movements in psychiatric patients treated with antipsychotic drugs, and normal individuals, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 46(6) (1983) 540-6.
- [10] A.Q. Rana, Z.M. Chaudry, P.J. Blanchet, New and emerging treatments for symptomatic tardive dyskinesia, *Drug design, development and therapy* 7 (2013) 1329-40.
- [11] M.F. Egan, Y. Hurd, J. Ferguson, S.E. Bachus, E.H. Hamid, T.M. Hyde, Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol, *Psychopharmacology* 127(4) (1996) 337-45.
- [12] C.M. Queiroz, R. Frussa-Filho, Effects of buspirone on an animal model of tardive dyskinesia, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 23(8) (1999) 1405-18.
- [13] O.A. Andreassen, H.A. Jorgensen, Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia?, *Progress in neurobiology* 61(5) (2000) 525-41.
- [14] M. Burger, R. Fachinnetto, L. Calegari, M.W. Paixao, A.L. Braga, J.B. Rocha, Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide, *Brain research bulletin* 64(4) (2004) 339-45.
- [15] J.L. Waddington, A.J. Cross, S.J. Gamble, R.C. Bourne, Spontaneous orofacial dyskinesia and dopaminergic function in rats after 6 months of neuroleptic treatment, *Science* 220(4596) (1983) 530-2.
- [16] J.M. Kane, J.M. Smith, Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979, *Archives of general psychiatry* 39(4) (1982) 473-81.
- [17] M.G. Woerner, J.M. Kane, J.A. Lieberman, J. Alvir, K.J. Bergmann, M. Borenstein, N.R. Schooler, S. Mukherjee, J. Rotrosen, M. Rubinstein, et al., The prevalence of tardive dyskinesia, *Journal of clinical psychopharmacology* 11(1) (1991) 34-42.
- [18] R. Fachinnetto, M.E. Burger, C. Wagner, D.C. Wondracek, V.B. Brito, C.W. Nogueira, J. Ferreira, J.B. Rocha, High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81(3) (2005) 585-92.
- [19] R. Fachinnetto, J.G. Villarinho, C. Wagner, R.P. Pereira, D.S. Avila, M.E. Burger, J.B. Calixto, J.B. Rocha, J. Ferreira, Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 31(7) (2007) 1478-86.
- [20] R. Fachinnetto, J.G. Villarinho, C. Wagner, R.P. Pereira, R.L. Puntel, M.W. Paixao, A.L. Braga, J.B. Calixto, J.B. Rocha, J. Ferreira, Diphenyl diselenide decreases the

prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats, *Psychopharmacology* 194(3) (2007) 423-32.

[21] D.E. Casey, Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models, *The Journal of clinical psychiatry* 61 Suppl 4 (2000) 5-9.

[22] E.M. Cornett, M. Novitch, A.D. Kaye, V. Kata, A.M. Kaye, Medication-Induced Tardive Dyskinesia: A Review and Update, *The Ochsner journal* 17(2) (2017) 162-174.

[23] M.M. Lima, M.L. Andersen, A.B. Reksidler, A.C. Ferraz, M.A. Vital, S. Tufik, Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion, *CNS & neurological disorders drug targets* 11(4) (2012) 359-68.

[24] J.B. Lohr, Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations, *Archives of general psychiatry* 48(12) (1991) 1097-106.

[25] M.B. Youdim, D. Edmondson, K.F. Tipton, The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors, *Nature reviews. Neuroscience* 7(4) (2006) 295-309.

[26] J.B. Lohr, R. Kuczenski, A.B. Niculescu, Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia, *CNS drugs* 17(1) (2003) 47-62.

[27] A. Pillai, V. Parikh, A.V. Terry, Jr., S.P. Mahadik, Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain, *Journal of psychiatric research* 41(5) (2007) 372-86.

[28] C.H. Cho, H.J. Lee, Oxidative stress and tardive dyskinesia: pharmacogenetic evidence, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 46 (2013) 207-13.

[29] C.M. de Freitas, A. Busanello, L.F. Schaffer, L.R. Peroza, B.N. Krum, C.Q. Leal, A.P. Ceretta, J.B. da Rocha, R. Fachineto, Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice, *Psychopharmacology* 233(3) (2016) 457-67.

[30] L.F. Schaffer, C.M. de Freitas, A.P. Chiapinotto Ceretta, L.R. Peroza, E. de Moraes Reis, B.N. Krum, A. Busanello, A.A. Boligon, J.H. Sudati, R. Fachineto, C. Wagner, Harpagophytum Procumbens Ethyl Acetate Fraction Reduces Fluphenazine-Induced Vacuous Chewing Movements and Oxidative Stress in Rat Brain, *Neurochemical research* 41(5) (2016) 1170-84.

[31] A. Busanello, C.Q. Leal, L.R. Peroza, J. Ropke, E. de Moraes Reis, C.M. de Freitas, M. Libardoni, N.B. de Vargas Barbosa, R. Fachineto, Resveratrol Protects Against Vacuous Chewing Movements Induced by Chronic Treatment with Fluphenazine, *Neurochemical research* (2017).

[32] A. Busanello, L.R. Peroza, C. Wagner, J.H. Sudati, R.P. Pereira, S. Prestes Ade, J.B. Rocha, R. Fachineto, N.B. Barbosa, Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine, *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 101(2) (2012) 307-10.

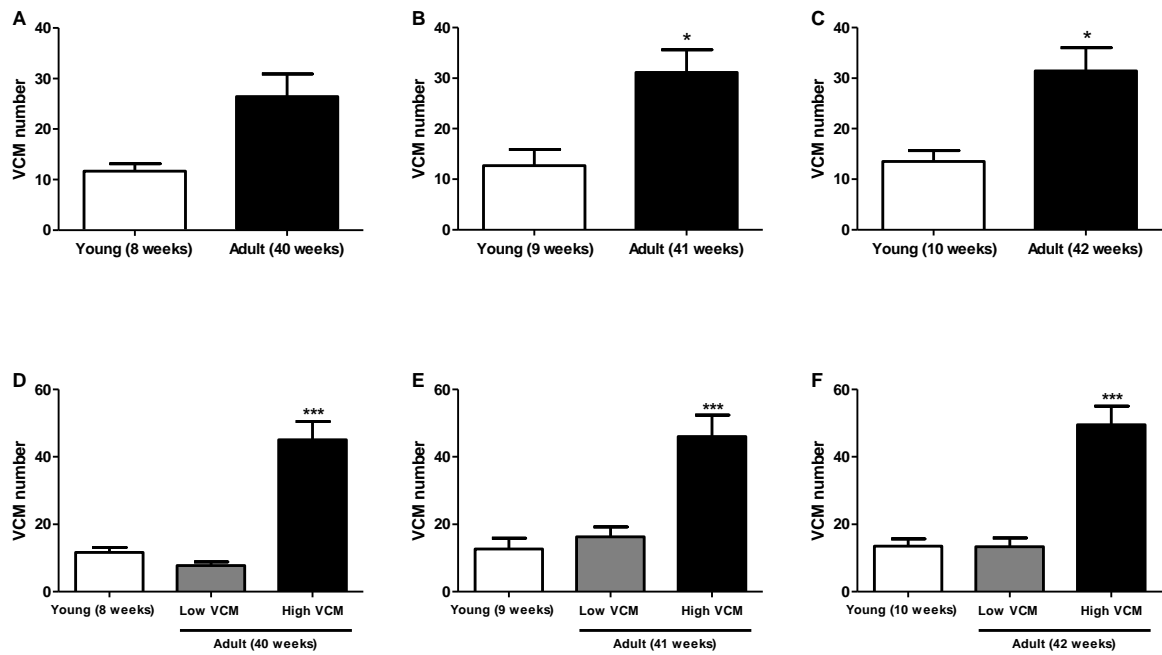
[33] L.R. Peroza, L.F. Schaffer, C.M. De Freitas, C.Q. Leal, M.C. Ferrari, M.M. Duarte, R. Fachineto, Alteration of Cytokines Levels in the Striatum of Rats: Possible Participation in Vacuous Chewing Movements Induced by Antipsychotics, *Neurochemical research* 41(9) (2016) 2481-9.

[34] J.D. Salamone, C.J. Johnson, L.D. McCullough, R.E. Steinpreis, Lateral striatal cholinergic mechanisms involved in oral motor activities in the rat, *Psychopharmacology* 102(4) (1990) 529-34.

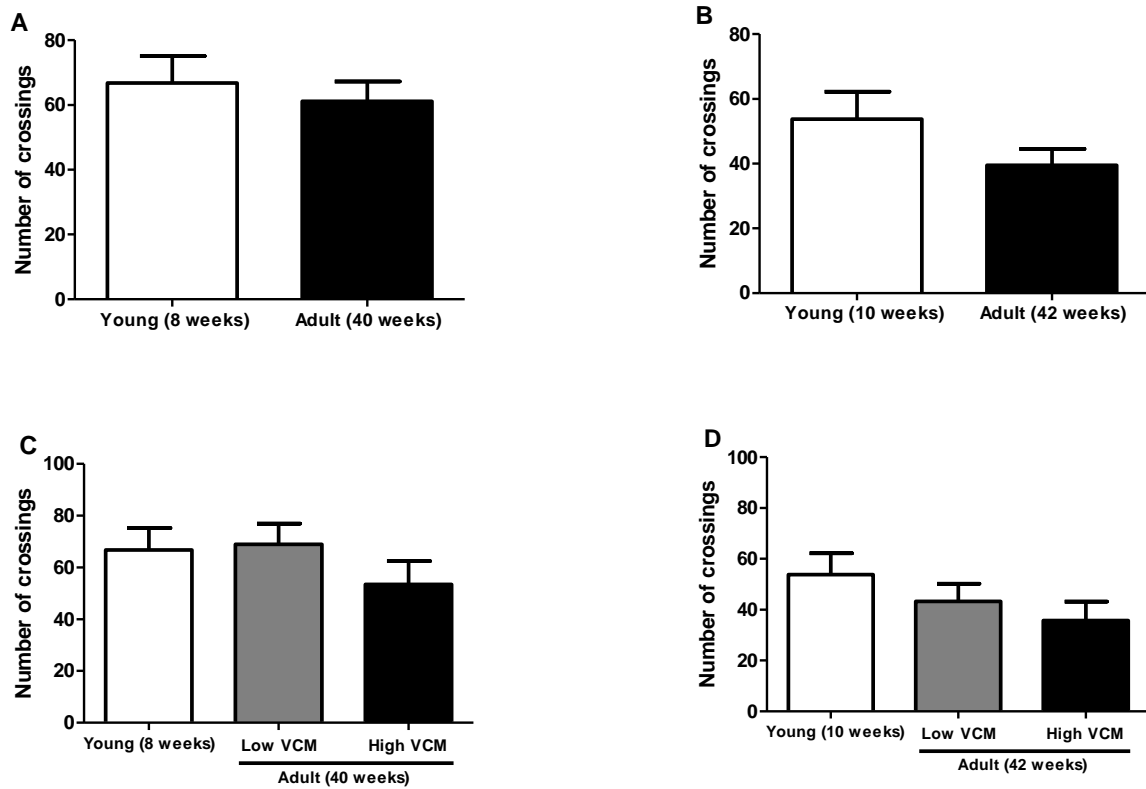
[35] P.L. Broadhurst, The place of animal psychology in the development of psychosomatic research, *Fortschritte der psychosomatischen Medizin. Advances in psychosomatic medicine* 1 (1960) 63-9.

- [36] A.E. Kelley, V.P. Bakshi, J.M. Delfs, C.G. Lang, Cholinergic stimulation of the ventrolateral striatum elicits mouth movements in rats: pharmacological and regional specificity, *Psychopharmacology* 99(4) (1989) 542-9.
- [37] J.D. Salamone, A.J. Mayorga, J.T. Trevitt, M.S. Cousins, A. Conlan, A. Nawab, Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor, *Progress in neurobiology* 56(6) (1998) 591-611.
- [38] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical biochemistry* 95(2) (1979) 351-8.
- [39] F. Perez-Severiano, M. Rodriguez-Perez, J. Pedraza-Chaverri, P.D. Maldonado, O.N. Medina-Campos, A. Ortiz-Plata, A. Sanchez-Garcia, J. Villeda-Hernandez, S. Galvan-Arzate, P. Aguilera, A. Santamaria, S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats, *Neurochemistry international* 45(8) (2004) 1175-83.
- [40] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods in enzymology* 105 (1984) 121-6.
- [41] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Archives of biochemistry and biophysics* 82(1) (1959) 70-7.
- [42] M. Reis Ede, F.W. Schreiner Neto, V.B. Cattani, L.R. Peroza, A. Busanello, C.Q. Leal, A.A. Boligon, T.F. Lehmen, M. Libardoni, M.L. Athayde, R. Fachineto, Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats, *BioMed research international* 2014 (2014) 958209.
- [43] I. Romero-Calvo, B. Ocon, P. Martinez-Moya, M.D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin, F.S. de Medina, Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots, *Analytical biochemistry* 401(2) (2010) 318-20.
- [44] G. Trevisan, C. Hoffmeister, M.F. Rossato, S.M. Oliveira, M.A. Silva, R.P. Ineu, G.P. Guerra, S. Materazzi, C. Fusi, R. Nassini, P. Geppetti, J. Ferreira, Transient receptor potential ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents, *Arthritis and rheumatism* 65(11) (2013) 2984-95.
- [45] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry* 193(1) (1951) 265-75.
- [46] J.D. Salamone, K. Ishiwari, A.J. Betz, A.M. Farrar, S.M. Mingote, L. Font, J. Hockemeyer, C.E. Muller, M. Correa, Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: possible relevance to parkinsonism, *Parkinsonism & related disorders* 14 Suppl 2 (2008) S130-4.
- [47] A. Busanello, N.B. Barbosa, L.R. Peroza, L.E. Farias, M.E. Burger, K.P. Barreto, R. Fachineto, Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice, *Behavioural pharmacology* 22(1) (2011) 71-5.
- [48] M. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao, H. Yi, Y. Yamaoka, Involvement of type A monoamine oxidase in neurodegeneration: regulation of mitochondrial signaling leading to cell death or neuroprotection, *Journal of neural transmission. Supplementum* (71) (2006) 67-77.
- [49] C.A. Lieu, S.J. Chinta, A. Rane, J.K. Andersen, Age-related behavioral phenotype of an astrocytic monoamine oxidase-B transgenic mouse model of Parkinson's disease, *PloS one* 8(1) (2013) e54200.
- [50] X.M. Ou, K. Chen, J.C. Shih, Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(29) (2006) 10923-8.
- [51] S.C. Daubner, T. Le, S. Wang, Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis, *Archives of biochemistry and biophysics* 508(1) (2011) 1-12.

- [52] A. Kastner, M.T. Herrero, E.C. Hirsch, J. Guillen, M.R. Luquin, F. Javoy-Agid, J.A. Obeso, Y. Agid, Decreased tyrosine hydroxylase content in the dopaminergic neurons of MPTP-intoxicated monkeys: effect of levodopa and GM1 ganglioside therapy, *Annals of neurology* 36(2) (1994) 206-14.
- [53] W.M. Caudle, J.R. Richardson, K.C. Delea, T.S. Guillot, M. Wang, K.D. Pennell, G.W. Miller, Polychlorinated biphenyl-induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to Parkinson's disease-associated dopamine toxicity, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 92(2) (2006) 490-9.
- [54] W.M. Caudle, J.R. Richardson, M.Z. Wang, T.N. Taylor, T.S. Guillot, A.L. McCormack, R.E. Colebrooke, D.A. Di Monte, P.C. Emson, G.W. Miller, Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(30) (2007) 8138-48.
- [55] Z. Fisar, Drugs related to monoamine oxidase activity, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 69 (2016) 112-24.
- [56] D.E. Edmondson, Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications, *Current pharmaceutical design* 20(2) (2014) 155-60.

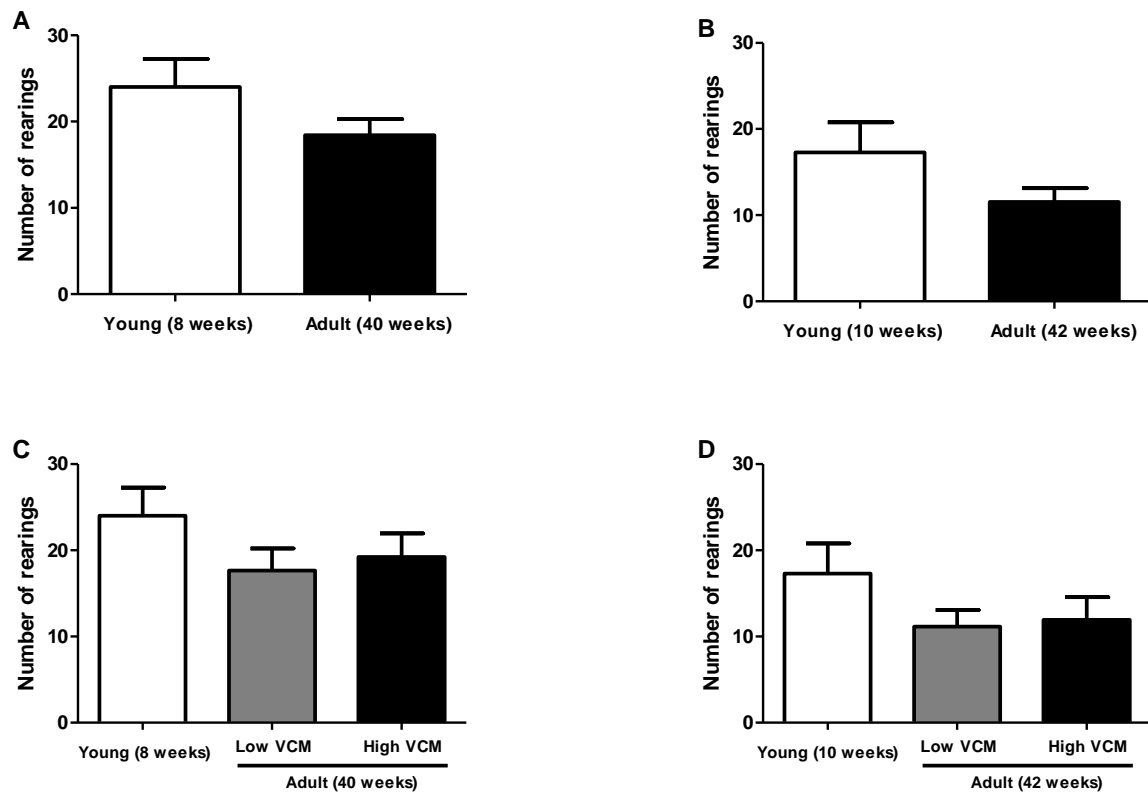


**Figure 1:** Number of vacuous chewing movements (VCMs) in 6 min related with age. Quantification of VCMs was performed in three consecutive weeks in animals with 8 or 40 weeks at first evaluation. Values of number of VCMs are presented as mean + SEM. Unpaired T test. \*  $p < 0.05$  represents significant differences compared to control in panel A, B and C. The groups were separated by the presence of High VCMs (D, E, F). Values of number of VCMs are presented as mean + SEM. One-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls. \*\*\*  $p < 0.001$  represents significant differences compared to control and Low VCM group

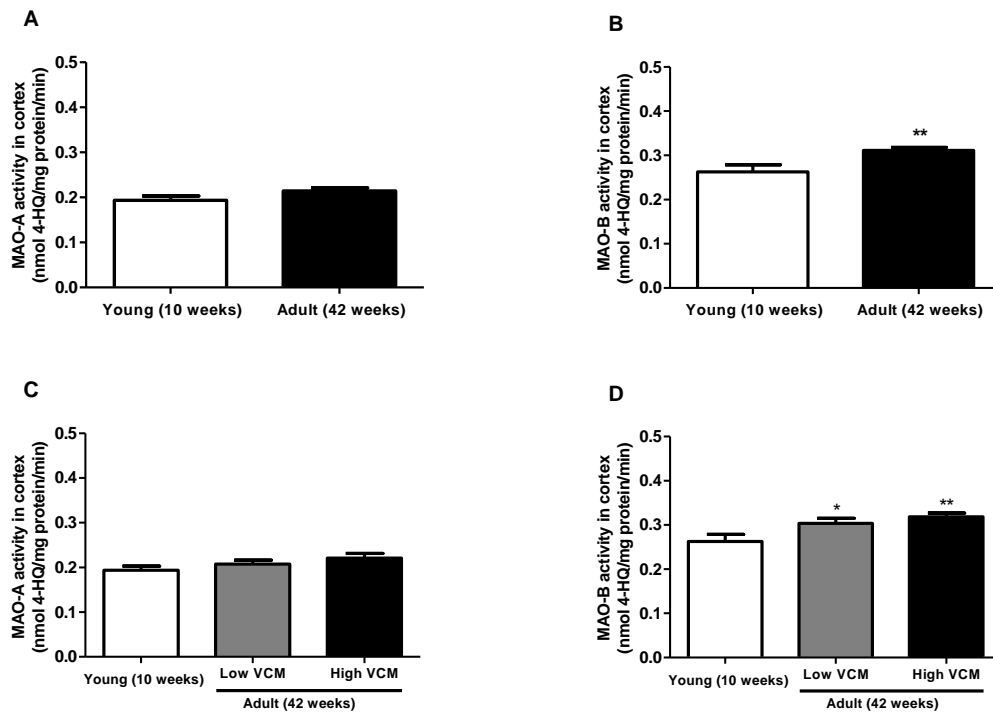


**Figure 2:** Evaluation of locomotor activity (quantified as the number of crossings) on the open field test in rats. Number of crossings in 5 min performed in animals with 8 and 40 weeks of age (A and C) and 10 and 42 weeks of age (B and D). Values of number of crossings are presented as mean + SEM. Unpaired T test (A and B) and One-way ANOVA (C and D) were performed. \*  $p < 0.05$  represents significant differences compared to control.

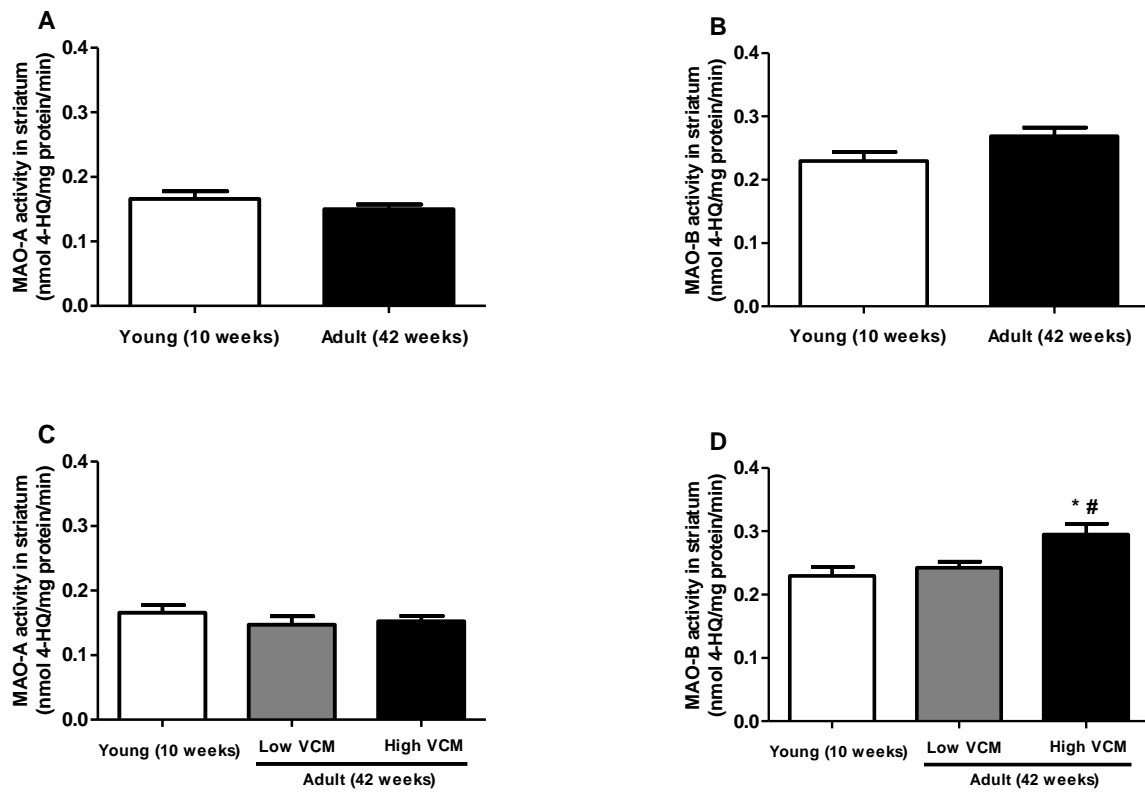




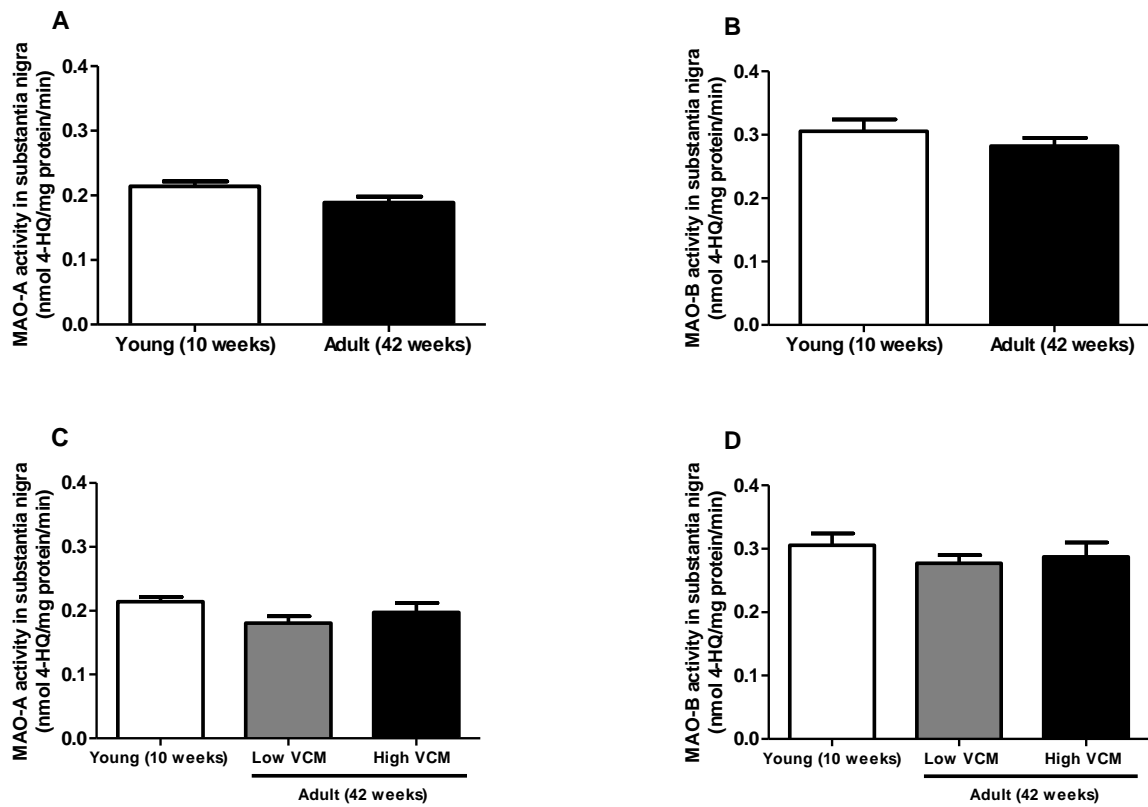
**Figure 3:** Evaluation of exploratory activity (quantified as the number of rearing) in the open field test in rats. Number of rearing in 5 min performed in animals with 8 or 40 weeks of age (A and C) and 10 or 42 weeks of age (B and D). Values of number of rearing are presented as mean + SEM. Unpaired T test (A and B) and One-way ANOVA (C and D) were performed.



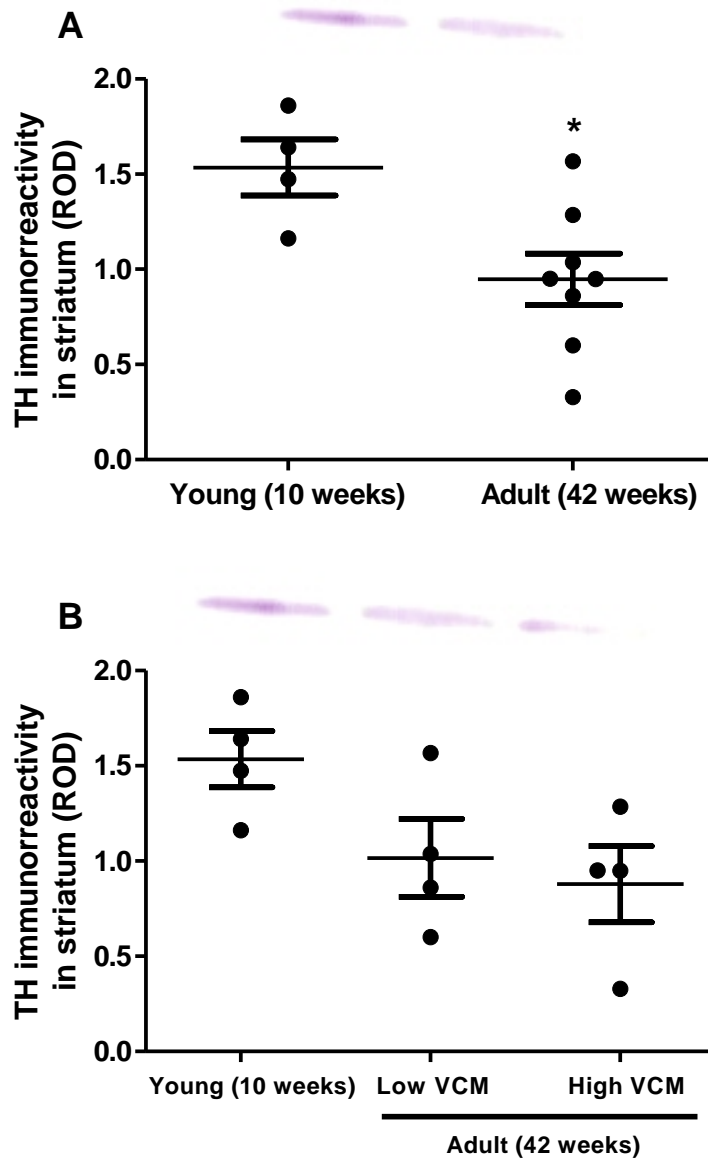
**Figure 4:** Quantification of MAO-A (A and C) and MAO-B (B and D) activity in region of cortex. Values of MAO activity are presented as mean + SEM. Unpaired T test (A and B) and One-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls (C and D). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to young adult animals.



**Figure 5:** Quantification of MAO-A (A and C) and MAO-B (B and D) activity in region of striatum. Values of MAO activity are presented as mean + SEM. Unpaired T test (A and B) and One-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls (C and D). \* $p < 0.05$  compared to young animals and # $p < 0.05$  compared to Low VCM animals.



**Figure 6:** Quantification of MAO-A (A and C) and MAO-B (B and D) activity in region containing the substantia nigra. Values of MAO activity are presented as mean + SEM. Unpaired T test (A and B) and One-way ANOVA (C and D).



**Figure 7:** TH immunoreactivity in striatum of rats. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Unpaired T test (A) and One-way ANOVA (B). \* $p < 0.05$  compared to young adult animals.

Table 1:

Brain Regions	Groups	DCFH-DA (DCFH-DA oxidation/mg protein)	Catalase ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}/\text{min}$ )	Proteic thiol ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein)	Non-proteic thiol ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein)	TBARS (nmol of MDA/mg of protein)
Cortex	Young (10 weeks)	402.3 $\pm$ 83.81	50.93 $\pm$ 7.50	190.6 $\pm$ 5.39	12.32 $\pm$ 0.74	0.25 $\pm$ 0.02
	Adult (42 weeks)	693.4 $\pm$ 52.82**	76.43 $\pm$ 7.26°	167.6 $\pm$ 5.41*	12.15 $\pm$ 0.40	0.19 $\pm$ 0.01**
Cortex	Young (10 weeks)	402.3 $\pm$ 83.81	50.93 $\pm$ 7.50	190.6 $\pm$ 5.39	12.32 $\pm$ 0.74	0.25 $\pm$ 0.02
	Low VCM (42 weeks)	678.1 $\pm$ 81.33	88.65 $\pm$ 11.39*	164.80 $\pm$ 9.30	12.14 $\pm$ 0.74	0.18 $\pm$ 0.01**
	High VCM (42 weeks)	708.7 $\pm$ 70.26*	63.27 $\pm$ 7.60	170.40 $\pm$ 5.82	12.17 $\pm$ 0.36	0.20 $\pm$ 0.01*
Striatum	Young (10 weeks)	48.04 $\pm$ 5.24	31.66 $\pm$ 6.17	112.80 $\pm$ 3.82	8.28 $\pm$ 0.37	0.25 $\pm$ 0.05
	Adult (42 weeks)	75.65 $\pm$ 4.79**	39.48 $\pm$ 7.80	119.90 $\pm$ 2.32	8.37 $\pm$ 0.35	0.22 $\pm$ 0.02
Striatum	Young (10 weeks)	48.04 $\pm$ 5.24	31.66 $\pm$ 6.17	112.80 $\pm$ 3.82	8.28 $\pm$ 0.37	0.25 $\pm$ 0.05
	Low VCM (42 weeks)	86.21 $\pm$ 7.03***	35.64 $\pm$ 7.24	119.50 $\pm$ 2.10	8.13 $\pm$ 0.47	0.21 $\pm$ 0.02
	High VCM (42 weeks)	65.10 $\pm$ 3.60*#	43.31 $\pm$ 14.47	120.30 $\pm$ 4.35	8.61 $\pm$ 0.54	0.22 $\pm$ 0.02
Substantia Nigra	Young (10 weeks)	1081 $\pm$ 311.9	67.51 $\pm$ 5.32	266.80 $\pm$ 26.80	12.90 $\pm$ 1.64	0.17 $\pm$ 0.02
	Adult (42 weeks)	475.20 $\pm$ 117.1*	54.54 $\pm$ 3.34°	276.92 $\pm$ 9.93	14.48 $\pm$ 1.02	0.23 $\pm$ 0.01*
Substantia Nigra	Young (10 weeks)	1081.00 $\pm$ 311.9	67.51 $\pm$ 5.32	266.80 $\pm$ 26.80	12.90 $\pm$ 1.64	0.17 $\pm$ 0.02
	Low VCM (42 weeks)	675.90 $\pm$ 224.00	56.34 $\pm$ 4.23	268.91 $\pm$ 14.49	13.61 $\pm$ 0.83	0.24 $\pm$ 0.02
	High VCM (42 weeks)	274.40 $\pm$ 24.59*	52.73 $\pm$ 5.28	284.93 $\pm$ 13.76	15.35 $\pm$ 1.87	0.22 $\pm$ 0.02

Data (mean  $\pm$  SEM) were analyzed using one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 compared to young adult animals; # p < 0,05 compared to Low VCM group; ° p = 0.05.

## 5 CONCLUSÕES

- Em nosso estudo foi observado que, assim como acontece quando há administração de antipsicóticos típicos animais de maior idade apresentaram o número de movimentos de mascar no vazio espontâneo aumentado em relação aos animais jovens.

- Na quantificação da atividade da enzima MAO, foi visto o aumento na atividade da MAO-B no estriado, com relação ao MMV e no córtex, com relação à idade. Acreditamos que a MAO-B está metabolizando uma maior quantidade de monoaminas, causando uma redução nas monoaminas disponíveis na fenda sináptica e que podem estar envolvida com alterações motoras, levando em consideração que estas regiões estão envolvidas no controle de movimentos.

- Com relação à imunorreatividade da TH, foi observada a diminuição da imunorreatividade da TH. Os resultados encontrados sugerem um possível processo de neurodegeneração, uma vez que a diminuição da imunorreatividade TH é atribuída a uma perda de neurônios.

- Também com relação à idade ocorreram as principais mudanças nos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes sendo apenas mudanças na atividade da catalase e oxidação DCFH-DA relacionada à presença de MMVs altas ou baixas. Corroborando com a hipótese de que a MAO contribui para o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

De maneira geral, podemos concluir que, assim como já era relatado na literatura em pacientes em tratamento com antipsicóticos, a idade contribuiu para a manutenção dos movimentos involuntários também naqueles que não fazem uso desses fármacos. Além disso, as mudanças em quase todos os mecanismos investigados são influenciadas pela idade nesses animais relacionados a alterações na atividade de MAO-B e a TH. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos com movimentos involuntários.

## REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. C. et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 263-272, 2004.
- ANDREASSEN, O. A. et al. Oral dyskinesias and morphological changes in rat striatum during long-term haloperidol administration. **Psychopharmacol (Berl)**, v. 157, p. 11-19, 2001.
- ANDREASSEN, O. A.; JORGENSEN, H. A. Neurotoxicity associated with neuroleptic induced oral dyskinesias. Implications for tardive dyskinesia? **Prog Neurobiol.**, v. 61, p. 525-541, 2000.
- ANDREASSEN, O. A.; STEEN, V. M. [Schizophrenia and molecular genetics]. **Tidss Nor Laegeforen**, v. 122, n. 21, p. 2118-2122, 2002.
- BACH, A. W. et al. cDNA cloning of human livermonoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 85, n. 13, p. 4934-4938, 1988.
- BARNES, T. R.; ROSSOR, M.; TRAUER, T. A comparison of purposeless movements in psychiatric patients treated with antipsychotic drugs, and normal individuals. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 46, p. 540-546, 1983.
- BLANCHET, P. J. Antipsychotic drug-induced movement disorders. **Can J Neurol Sci**. v. 30 (Suppl 1), p. S101-S107, 2003.
- BLANCHET, P. J. et al. Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. **Behavioral and Brain Functions**, v. 8, p. 12, 2012.
- BORDIA, T. et al. Striatal cholinergic interneurons and D2 receptor-expressing GABAergic medium spiny neurons regulate tardive dyskinesia. **Experimental Neurology**, v. 286, p. 32-39, 2016.
- BOŠKOVIČ, M. Oxidative Stress in Schizophrenia. **Current Neuropharmacology**, v. 9, p. 301-312, 2011.
- BURGER, M. et al. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. **Brain Research**, v. 1031, p. 202-210, 2005.
- \_\_\_\_\_. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin.**, v. 64, p. 339-345, 2004.
- BUSANELLO, A. et al. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 101, p. 307-310, 2012.
- \_\_\_\_\_. Resveratrol Protects Against Vacuous Chewing Movements Induced by Chronic Treatment with Fluphenazine. **Neurochem Res.** DOI 10.1007/s11064-017-2335-4.



- CALABRESI, P. et al. Chronic Neuroleptic Treatment: D2 dopamine receptor supersensitivity and striatal glutamatergic transmission. **Ann. Neurol.**, v. 31, p. 366-373, 1992.
- CASEY, D. E. Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. **J Clin Psychiat**, v. 61 (Suppl 4), p. 5-9, 2000.
- CASTRO, J. P. et al. Effects of baclofen on reserpine induced vacuous chewing movements in mice. **Brain Res Bull**, v. 68, p. 436-441, 2006.
- CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. The “ABC” of GABA receptors: A brief review. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, p. 937-940, 1999.
- CHO, C. H.; LEE, H. J. Oxidative stress and tardive dyskinesia: Pharmacogenetic evidence. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 46, p. 207-213, 2013.
- CHOUINARD, G. et al. Antipsychotic-Induced Dopamine Supersensitivity Psychosis: Pharmacology, Criteria, and Therapy. **Psychother Psychosom**, v. 86, p. 189-219, 2017.
- CORNETT, E. M. et al. Medication-induced tardive dyskinesia: A Review and Update. **Ochsner J.**, v. 17, n. 2, p. 162-174, 2017.
- COWARD, D. M. Nigral actions of GABA agonists are enhanced by chronic fluphenazine and differentiated by concomitant flurazepam. **Psychopharmacology**, v. 76, p. 294-298, 1982.
- DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508 p. 1-12, 2011.
- DE FREITAS, C. et al. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. **Psychopharmacology**, v. 233, p. 457-467, 2016.
- DUTRA, R. C. et al. Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, p. 487-495, 2002.
- EGAN, M. F. et al. Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol. **Psychopharmacology**, v. 127, p. 337-345, 1996.
- EIDEN, L. E. et al. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. **Eur J Physiol**, v. 447, p. 636-640, 2004.
- ERIKSEN, J.; JORGENSEN, T. N.; GETHER, U. Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. **J. Neurochem**, v. 113, p. 27-41, 2010.
- FACHINETTO, R. et al. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. **Psychopharmacology**, v. 194, p. 423-32, 2007a.

- FACHINETTO, R. et al. High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 81, p. 585-92, 2005.
- \_\_\_\_\_. Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 31, p. 1478-1486, 2007b.
- FARIA, R. R. et al. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 993-1001, 2005.
- FENTON, W. S. Prevalence of spontaneous dyskinesia in schizophrenia. **J Clin Psychiatry**. v. 61 (suppl 4), p. 10-14, 2000.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FISAR, Z. Drug related to monoamine oxidase activity. **Prog. Neuro-Psychopharmacol Biol. Psychiatry.**, v. 69, p. 112-124, 2016
- FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **Am J Med**, v. 97, n. 3A, p. 5S-13S, 1994.
- GITTIS, A. H. et al. Distinct roles of gabaergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 2223-2234, 2010.
- GOFF, D.; COYLE, J. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **Am J Psychiatry** v. 158, p. 1367-1377, 2001.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends. Pharmacol. Sci.** v. 32, p. 125-130, 2011.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4. ed. **Oxford University Press**, Oxford, 2007.
- HARVEY, B. H.; NEL, A. Role of aging and striatal nitric oxide synthase activity in an animal model of tardive dyskinesia. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 407-416, 2003.
- HOWES, O.D.; MURRAY, R.B. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. *Lancet.*, 383(9929), 1677–1687, 2014.
- JOHNSTON, J. P: Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochem Pharmacol**, v. 17, n. 7, p. 1285-1297 1968.
- KAHLIG, K. M.; GALLI, A. Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. **Eur J Pharmacol**. v. 479, n. 1-3, p. 153-158, 2003.
- KANE, J. M.; SMITH, J. M. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. **Arch Gen Psychiatry.**, v. 39, p. 473-481, 1982.

KAPRACZAK, V. et al. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. DOI: 10.1016/j.pbb.2017.01.005.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, anti-oxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, p. 620-50, 2002.

LEE, M. J. et al. Antipsychotics-Induced Tardive Syndrome: A Retrospective Epidemiological Study. **Clinical Neuropharmacology**, v. 37, n. 4, p. 111-115, 2014.

LIMA, M. M. S. et al Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, p. 359-368, 2012.

LODGE, D.; ANIS, N. A. Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat. **Eur J Pharmacol.**, v. 77, n. 2-3, p. 203-4, 1982.

LOHR, J. B. Oxygen free radicals and neuropsychiatric illness. **Arch Gen Psychiatry.**, v. 48, p. 1097-1106, 1991.

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

LOONEN, A. J.; IVANOVA, S. A. New insights into the mechanism of drug-induced dyskinesia. **CNS Spectr.**, v. 18, n. 1, p. 15-20, 2013.

MACALUSO, M.; FLYNN, A.; PRESKORN, S. H. Tardive Dyskinesia: A Historical Perspective. **Psychopharmacology: Journal of Psychiatric Practice**, v. 23, n. 2, 2017.

MAHMOUDI, S.; LÉVESQUE, D.; BLANCHET, P. J. Upregulation of dopamine D3, not D2, receptors correlates with tardive dyskinesia in a primate model. **Mov Disord.** v. 29, n. 9, p. 1125-1133, 2014.

MALLET N, L. E. et al. Feedforward inhibition of project neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 15, p. 3857-69, 2005.

MARCHESE, G. et al. Haloperidol versus risperidone on rat "early onset" vacuous chewing. **Behav Brain Res**, v. 149, p. 9-16, 2004.

MARCOTTE, E. R.; PEARSON, D. M.; SRIVASTAVA, L. K. Animal models of Schizophrenia. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 26, n. 5, p. 395-410, 2001.

MARSDEN, C. A. Dopamine: The rewarding years. **Brits. Jour. Pharm.**, v. 147, p. S136-S144, 2006.

MARSDEN, D. C.; JENNER, P. The pathophysiology of extrapyramidal side-effects of neuroleptic drugs. **Psychological Medicine**, v. 10, p. 55-72, 1980.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. Complexity of dopamine metabolism. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, p. 34, 2013.

- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. **J Nutri**, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.
- MELTZER, H. Y. What's atypical about atypical antipsychotic drugs? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 53-57, 2004.
- MERRILL, R. M.; LYON, J. L.; MATIACO, P. M. Tardive and spontaneous dyskinesia incidence in the general population. **BMC Psychiatry**, v. 13, p. 152, 2013.
- MILLER, R.; CHOUNARD, G. Loss of striatal cholinergic neurons as a basis for tardive and L-dopa-induced dyskinesias, neuroleptic-induced supersensitivity psychosis and refractory schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 34, n. 10, p. 713-38, 1993.
- NAKAZAWA, K. et al. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1574-83, 2012.
- NAPOLITANO, A.; CESURA, A. M.; PRADA, M. D. The role of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission. **J Neural Transm Suppl**, v. 45, p. 35-45, 1995.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, p. 1287-312, 2001.
- OBESO, J. A. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 23, p. S548-S559, 2008.
- OLNEY, J.; FARBER, N. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 52, p. 998-1007, 1995.
- PILLAI, A. et al. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: Differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidants enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. **J Psychiatr Res.**, v. 41, p. 372-386, 2007.
- PRATT, J. et al. Advancing schizophrenia drug discovery: optimizing rodent models to bridge the translational gap. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, p. 560-579, 2012.
- QUEIROZ, C. M. T.; FRUSSA-FILHO, R. Effects of Bupirone on an animal model of tardive dyskinesia. **Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat.**, v. 23, p. 1405-1418, 1999.
- RECKZIEGEL, P. et al. Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 104, p. 132-137, 2013.
- RHAGAVENDRA, V.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Reversal of reserpine-induced vacuous chewing movements in rats by melatonin: involvement of peripheral benzodiazepine receptors. **Brain. Res.**, v. 904, n. 1, p. 149-52, 2001.
- ROGUE, P. et al. Up-regulation of dopamine D 2 receptor mRNA in rat striatum by chronic neuroleptic treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 207, p. 165-168, 1991.

SADAN, O. et al. A novel brain-targeted antioxidant (AD4) attenuates haloperidol-induced abnormal movement in rats: implications for tardive dyskinesia. **Clin Neuropharmacol.**, v. 28, p. 285-288, 2005.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, p. 442-455, 2013.

SCHAFFER, L. F. et al. Harpagophytum procumbens ethyl acetate fraction reduces Fluphenazine-induced vacuol chewing movements and oxidative stress in rat brain. **Neurochem. Res.**, v. 41, n. 5, p. 1170-84, 2016.

SEEMAN, M. V.; SEEMAN, P. Is schizophrenia a dopamine supersensitivity psychotic reaction? **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 48, p. 155-160, 2014.

SMITH, Y.; VILLALBA, R. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and parkinsonian brains. **Mov. Disord.**, v. 23, p. S534-S547, 2008.

SOTO-OTERO, R. et al. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. **Life Sci.**, v. 69, p. 879-889, 2001

STEEDS, H.; CARHART-HARRIS, R. L.; STONE, J. M. Drug models of Schizophrenia. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 43-58, 2015.

TAMMIGA, C. A.; CARLSSON, A. Partial dopamine agonists and dopaminergic stabilizers, in the treatment of psychosis. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.**, v. 1, n. 2, p. 141- 7, 2002.

TAYOSHI, S. Y. et al. GABA concentration in schizophrenia patients and the effects of antipsychotic medication: A proton magnetic resonance spectroscopy study. **Schizophrenia Research**, v. 117, p. 83-91, 2010.

TEO, J. M.; EDWARDS, M. J.; BHATIA, K. Tardive dyskinesia is caused by maladaptive synaptic plasticity: a hypothesis. **Mov. Disord.**, v. 27, p. 1205-1215, 2012.

THAKER, G. K. et al. Brain  $\gamma$ -aminobutyric acid abnormality in tardive dyskinesia. **Arch Gen. Psychiatric**, v. 44, p. 523-529, 1987.

TROTTI, D. et al. Neuronal and glial glutamate transporters possess a SH-based redox regulatory mechanism. **Eur. J. Neurosci.**, v. 9, p. 1236-1243, 1999.

TURRONE, P. et al. The relationship between dopamine D2 receptor occupancy and the vacuol chewing movement syndrome in rats. **Psychopharmacology**, v. 165, p. 166-171, 2003.

TURRONE, P.; REMINGTON, G.; NOBREGA, J. N: The vacuol chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D2 receptor occupancy? **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 26, p. 361-380, 2002.

WADDINGTON, J. L. et al. Spontaneous orofacial dyskinesia and dopaminergic function in rats after 6 months of neuroleptic treatment. **Science**, v. 220, p. 530-532, 1982.

WANG, M. H. et al. (-) Epigallocatechin-3-gallate attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 131, p. 71-76, 2015.

WEIHE, E. et al. Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. **J. Mol. Neurosci.**, v. 5, p. 149-164, 1994.

WOERNER, M. G. et al. The prevalence of tardive dyskinesia. **J Clin Psychopharmacol.**, v. 11, p. 34-42, 1991.

\_\_\_\_\_. Prospective study of tardive dyskinesia in the elderly: rates and risk factors. **Am. J. Psychiatry.**, v. 155, p. 1521-1528, 1998.

YODER, K. K. et al. Dopamine transporter density in schizophrenic subjects with and without tardive dyskinesia. **Schizophr. Res.**, v. 71, p. 371-375, 2004.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TRIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 295-309, 2006.

YOUDIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S287-S296, 2006.

**ANEXO**



## ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM RATOS COM DISCINESIA ESPONTÂNEA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos com discinesia espontânea", protocolado sob o CEUA nº 7977261114, sob a responsabilidade de **Roselei Fachineto** e equipe: Alcindo Busanello; Caroline Pilecco Barbosa; Caroline Queiroz Leal; Catiuscia Molz de Freitas; Getúlio Nicola Bressan; Larissa Finger Schaffer - 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 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em reunião de 29/04/2015.

We certify that the proposal "Evaluation of behavioral and biochemical parameters in rats with spontaneous dyskinesia", utilizing 10 Heterogenics rats (10 males), protocol number CEUA 7977261114, under the responsibility of **Roselei Fachineto** and team: Alcindo Busanello; Caroline Pilecco Barbosa; Caroline Queiroz Leal; Catiuscia Molz de Freitas; Getúlio Nicola Bressan; Larissa Finger Schaffer - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 04/29/2015.

Vigência da Proposta: de 05/2015 a 12/2017

Área: Fisiologia E Farmacologia

Procedência: Biotério Central UFSM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

Idade: 2 a 2 meses

N: 10

Linhagem: Wistar

Peso: 220 a 250 g

Resumo: A discinesia tardia é um distúrbio do movimento que se desenvolve em decorrência do uso prolongado de antipsicóticos em aproximadamente 20% dos pacientes e possui com fator de risco e também de agravamento a idade. Esse distúrbio é, muitas vezes, incapacitante e irreversível, de tal forma que há a necessidade de se entender seu mecanismo de desenvolvimento/manutenção bem como de formas eficazes de tratamento. Sabe-se que indivíduos que não fazem uso de antipsicóticos podem desenvolver distúrbios involuntários do movimento espontâneos e que pioram com a idade. Desta forma, o estudo da discinesia espontânea é de grande importância, pois é possível investigar seus mecanismos sem que para isso precise utilizar um fármaco como agente indutor. Dados da literatura demonstram que em animais experimentais (ratos), a discinesia espontânea possui uma prevalência em torno de 5%, a qual é caracterizada pelos distúrbios do movimento sem qualquer ingestão ou administração de fármacos. Seguindo protocolos de outros autores, animais que apresentam discinesia espontânea são descartados de nossos experimentos para que não gerem resultados falso positivos. Desta forma, o presente projeto propõe a utilização destes animais que serão descartados de outros experimentos (previamente aprovados pela CEUA) para o estudo dos mecanismos relacionados às discinesias espontâneas. Para isto, a cada animal (com aproximadamente 2 meses de idade) que apresentar discinesia espontânea no comportamento prévio à administração de fármacos, será incluído no experimento de discinesia espontânea e também será incluído um animal do mesmo grupo, porém sem discinesia espontânea. Colocaremos ambos os animais em uma caixa e manteremos os mesmos no biotério do departamento de Fisiologia e Farmacologia até completarem 10 meses de idade. Este tempo de espera será necessário em função de que alguns animais só desenvolvem a discinesia espontânea quando possuem mais idade e servirá para que evitemos a interpretação errônea de algum fator. Iremos aumentar o n (número de animais por grupo) até que atinjamos um número de 10 animais com discinesia e 10 animais sem discinesia. Incluiremos no experimento também 8 animais controle sem discinesia e com 2 meses de idade (estes sim, animais que serão adquiridos no biotério central apenas para a realização deste experimento) para que o fator idade também possa ser analisado. Serão avaliados parâmetros comportamentais característicos de distúrbios motores (número de movimentos de mascar no vazio e de protrusões de língua, tempo de tremor facial dos animais) bem como a atividade locomotora, exploratória e comportamento relacionado à ansiedade (labirinto em cruz elevada). Após as análises comportamentais os animais serão anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg, I.m.) mortos por decapitação. O córtex, substância negra, estriado e hipocampo serão utilizados para análise de parâmetros relacionados ao sistema dopaminérgico (imunoreatividade da tirosina hidroxilase, do transportador de dopamina e receptor D2, bem como a atividade da MAO), ao estresse oxidativo (oxidação da diclorofluoresceína, nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e de tióis, atividade da catalase e da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) e sinalização celular via Akt. Acreditamos que através deste experimento poderemos elucidar alguns mecanismos que sejam comuns a outras doenças motoras e que possam ser alvos de futuros estudos farmacológicos buscando seu tratamento e melhoria na qualidade de vida das pessoas que são acometidas por tais distúrbios.

Santa Maria, 18 de março de 2016

Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Brock Roseberg  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria