

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES  
ENVOLVIDOS EM EFEITOS COMPORTAMENTAIS  
INDUZIDOS POR RESERPINA EM RATOS E *C. elegans*  
COM ÊNFASE EM PARÂMETROS OXIDATIVOS E  
DOPAMINÉRGICOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Patrícia Reckziegel**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES  
ENVOLVIDOS EM EFEITOS COMPORTAMENTAIS  
INDUZIDOS POR RESERPINA EM RATOS E *C. elegans* COM  
ÊNFASE EM PARÂMETROS OXIDATIVOS E  
DOPAMINÉRGICOS**

**Patrícia Reckziegel**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de  
Concentração em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Farmacologia**

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

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Escobar Burguer**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

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

Reckziegel, Patrícia  
MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS EM  
EFEITOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR RESERPINA EM RATOS  
E *C. elegans* COM ÊNFASE EM PARÂMETROS OXIDATIVOS E  
DOPAMINÉRGICOS / Patrícia Reckziegel.-2015.  
94 p.; 30cm

Orientadora: Roselei Fachinetto  
Coorientadora: Marilise Escobar Burguer  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2015

1. discinesia orofacial 2. doença de Parkinson 3.  
dopamina 4. neurodegeneração 5. reserpina I. Fachinetto,  
Roselei II. Escobar Burguer, Marilise III. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Patrícia Reckziegel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço eletrônico: [patriciareckziegel@hotmail.com](mailto:patriciareckziegel@hotmail.com)

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

**MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES  
ENVOLVIDOS EM EFEITOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS  
POR RESERPINA EM RATOS E *C. elegans* COM ÊNFASE EM  
PARÂMETROS OXIDATIVOS E DOPAMINÉRGICOS**

elaborada por  
**Patrícia Reckziegel**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Dra. Roselei Fachineto** (Presidente/Orientadora)

---

**Dra. Daiana Silva de Ávila** (UNIPAMPA)

---

**Dra. Caroline Wagner** (UNIPAMPA)

---

**Dr. Gustavo Orione Puntel** (UFSM)

---

**Dr. Denis Broock Rosemberg** (UFSM)

Santa Maria, 16 de janeiro de 2015



## AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus, à Nossa Senhora Aparecida e ao meu Anjo da Guarda por sempre me iluminarem, guiarem meus passos e me darem forças nesta e em todas as caminhadas.

Aos meus queridos pais Telmo e Inês pela vida, amor, carinho e apoio. Obrigada pelos ensinamentos, por terem me incentivado na busca dos meus objetivos, sem medir esforços. Eis aqui os meus eternos agradecimentos por tudo o que vocês fizeram e continuam fazendo por mim.

As minhas irmãs, Caroline e Simone, pelo carinho e apoio.

A minha orientadora, Pr<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roselei Fachinetto, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos conhecimentos ensinados, pela amizade e pela confiança que me foi depositada. À senhora, meus sinceros agradecimentos.

Ao Pr. Dr. Michael Aschner, que me recebeu em seu laboratório nos Estados Unidos, possibilitando assim que eu tivesse uma das melhores experiências da minha vida até então, tanto no laboratório quanto fora dele. Também agradeço por sempre estar disposto a ajudar. Meus sinceros agradecimentos.

A minha co-orientadora, Pr<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Escobar Burguer, com a qual aprendi a amar pesquisa e a pensar como cientista desde a minha iniciação científica.

Aos meus colegas do laboratório 5209, Alcindo, Ana Paula, Bárbara, Caroline Leal, Caroline Pileco, Catiúscia, Elizete, Getúlio, Jeane, Larissa, Luis, Mariana e Mayara, pela amizade, momentos felizes e contribuição na realização deste trabalho. Vou sentir saudades!

Aos colegas do laboratório do Prof Aschner, Julia, Megan, Nancy, Pan, Priscila, Sam, Sudipta, Thuy, por me acolherem e me ensinarem a trabalhar com os *C. elegans*.

À banca examinadora por suas contribuições ao trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realizar este curso.

À FAPERGS pela bolsa de estudos concedida, bem como à CAPES pela bolsa PDSE.

A todos aqueles (não mencionados até então) que contribuíram para a realização deste sonho.

O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.

(Eleanor Roosevelt)

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS EM EFEITOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR RESERPINA EM RATOS E *C. elegans* COM ÊNFASE EM PARÂMETROS OXIDATIVOS E DOPAMINÉRGICOS

AUTORA: PATRÍCIA RECKZIEGEL

ORIENTADORA: ROSELEI FACHINETTO

CO-ORIENTADORA: MARILISE ESCOBAR BURGUER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de janeiro de 2015.

Modelos animais como o da reserpina auxiliam no entendimento da fisiopatologia de diversas doenças que se manifestam por movimentos involuntários, como a doença de Parkinson (DP), e na busca por formas de tratamento. O presente trabalho avaliou mecanismos envolvidos na indução de alterações comportamentais induzidas por reserpina em ratos e vermes com ênfase em parâmetros oxidativos e dopaminérgicos, e a ação do antioxidante ácido gálico (AG) em ratos tratados com reserpina. Como resultado, a reserpina (1mg/Kg, sc, por 3 dias consecutivos) aumentou a frequência de movimentos de mascar no vazio (MMVs) em ratos em relação ao controle, e manteve esse aumento por pelo menos 3 dias após o término das administrações da reserpina. O tratamento com AG (4,5 ou 13,5 ou 40,5 mg/kg/day, vo) por 3 dias reverteu esse aumento dos MMVs, mostrando efeito protetor. Nem reserpina nem o AG alteraram os parâmetros avaliados de dano oxidativo (TBARS e oxidação da DCFH-DA), de antioxidantes (tiol protéico e não protéico) e a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (total e  $\alpha$ -subunidade) no estriado e córtex cerebral. Estudos posteriores foram realizados em *Caenorhabditis elegans* devido as diversas vantagens oferecidas por esse modelo animal em estudos de neurodegeneração e de investigação do mecanismo de ação de drogas. *C. elegans* em estágio larval L1 foram expostos a reserpina (30 ou 60  $\mu\text{M}$ ) por diferentes tempos. A reserpina reduziu a sobrevivência, o desenvolvimento, a ingestão de alimento, a atividade locomotora na comida e as concentrações de dopamina (DA) nos vermes, e afetou a postura de ovos e tempo entre defecações. Análise da morfologia dos neurônios dopaminérgicos cefálicos (CEP) de vermes BY200 (com GFP acoplado ao gene *dat-1*) indicam neurodegeneração por: 1) redução da intensidade da fluorescência, 2) redução do número de neurônios intactos e 3) aumento do número de somas atrofiados por verme em relação ao controle. Esses efeitos não estão relacionados a efeitos da reserpina na expressão do gene *dat-1*. Interessantemente, os efeitos da reserpina na atividade locomotora, na morfologia dos neurônios CEP e na expressão do gene *dat-1* foram revertidos após a retirada dos vermes da exposição a reserpina. Em adição, a reserpina reduziu a sobrevivência de vermes deficientes do transportador vesicular de monoaminas (TVMs, *cat-1*) e do transportador de DA (DAT, *dat-1*), mas não alterou a sobrevivência de deficientes da tirosina hidroxilase (TH, *cat-2*) e dos receptores dopaminérgicos (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3* e *dop-4*) em relação aos vermes selvagens N2. A reserpina também reduziu a sobrevivência de vermes N2 pré-expostos a DA, e ativou a via de detoxificação SKN-1 dos vermes. Alterações na imunoreatividade ao DAT e a TH no estriado de ratos tratados com reserpina e/ou AG não foram encontradas. O efeito protetor do AG nos MMVs induzidos por reserpina em ratos parece não envolver sua atividade antioxidante, antiapoptótica ou na monoaminoxidase (MAO). Como conclusão, a reserpina age no TVMs causando depleção de DA, e causa neurotoxicidade/neurodegeneração dopaminérgica devido provavelmente a um acúmulo de DA no espaço sináptico resultante de uma interferência no funcionamento do DAT. Mais estudos avaliando a ação da reserpina no DAT e o mecanismo de proteção do AG são necessários.

**Palavras-chave:** discinesia orofacial. doença de Parkinson. dopamina. neurodegeneração. reserpina. transportador de dopamina.

## ABSTRACT

Thesis  
Post-Graduate Course in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN BEHAVIORAL EFFECTS INDUCED BY RESERPINE IN RATS AND *C. elegans* WITH ENPHASIS IN OXIDATIVE AND DOPAMINERGIC PARAMETERS**

**AUTHOR: PATRÍCIA RECKZIEGEL**

**ADVISOR: ROSELEI FACHINETTO**

**CO-ADVISOR: MARILISE ESCOBAR BURGUER**

**Place and Date of the Defense: Santa Maria, January 16<sup>th</sup>, 2015.**

Animal models as reserpine are helpful to understand the pathophysiology of several diseases with involuntary movements, as Parkinson's disease (PD), and to search efficient treatments. The present study tested the effects of reserpine on behavioral alterations induced by reserpine in rats and worms, with emphasis in oxidative and dopaminergic parameters, and the effect of the antioxidant gallic acid (GA) in reserpine-exposed rats. As result, reserpine (1mg/Kg, sc, for 3 consecutive days) increased the frequency of vacuous chewing movements (VCMs) in rats in relation to controls, and maintained this increase for at least 3 days after reserpine withdrawal. Treatment with GA (4.5 , 13.5 or 40.5 mg/kg/day, po) for 3 days reverted reserpine-induced increase in VCMs, showing protective effect. Neither reserpine nor GA changed oxidative parameters (TBARS and DCFH-DA oxidation), antioxidant levels (proteic and non-proteic thiol) and the activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (total and  $\alpha$ -subunit) in striatum and cortex. Afterward, studies were performed with *Caenorhanditis elegans* due its several advantages in studies of neurodegeneration and of drugs mechanism of action. L1-larval stage *C. elegans* were exposed to reserpine (30 ou 60  $\mu$ M) for different times. Reserpine decreased the survival, development, food intake, locomotor rate on food and dopamine (DA) levels in worms and it had effect on egg laying and defecation cycles. Morphological evaluations of dopaminergic cephalic (CEP) neurons in BY200 worms (with GFP coupled to *dat-1* gene) reveled neurodegeneration by: 1) decreased fluorescence intensity, 2) decreased the number of intact neurons, and 3) increased the number of shrunken somas per worm. These effects were unrelated to reserpine's effect on *dat-1* gene expression. Interestingly, the reserpine effects on locomotor rate, dopaminergic CEP neurons morphology and *dat-1* gene expression were reverted after reserpine withdrawal. Furthermore, reserpine decreased the survival of vesicular monoamine transporter (VMAT) and *dat-1* loss-of-function mutant worms, but no of tyrosine hydroxylase (TH, *cat-2*) and dopaminergic receptors (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3* e *dop-4*) loss-of-function mutants in relation to *wild-type* N2 worms. Reserpine also decreased the survival of worms pre-exposed to DA; and it activated SKN-1 detoxification pathway. Moreover, no differences were found in DAT and TH immunoreactivity in striatum of rats treated with reserpine and/or GA. The GA protective effects against reserpine-induced VCMs in rats are probably not related to its antioxidant and antiapoptotic properties or monoamine oxidase (MAO) inhibition. As conclusion, the reserpine decreases DA levels though action on VMAT, and it induces neurotoxicity/neurodegeneration due probably an increase on extracellular DA contents resulted from changes on DAT function. More studies evaluating the reserpine effect on DAT and the GA mechanism of protection are necessary.

**Keywords:** dopamine. dopamine transporter. neurodegeneration. orofacial dyskinesia. Parkinson's disease. reserpine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Terminal de um neurônio dopaminérgico .....	16
<b>Figura 2</b> – Principais vias dopaminérgicas do encéfalo de humanos .....	18
<b>Figura 3</b> – <i>C. elegans</i> em diferentes fases do desenvolvimento .....	28
<b>Figura 4</b> – Representação genérica de uma sinapse dopaminérgica de <i>C. elegans</i> .....	31
<b>Figura 5</b> – Efeitos da reserpina no sistema dopaminérgico de <i>C. elegans</i> .....	69

### ARTIGO 1

<b>Figura 1</b> – Experimental desing.....	38
<b>Figura 2</b> – (A) VCM during 6 min in rats treated with reserpine (1 mg/kg/day, s.c., for three days) or its vehicle (day 4). (B) VCM during 6 min in rats treated with different doses of gallic acid (GA, 4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o., for three days) or water, after previous treatment with reserpine (1 mg/kg/day, s.c. for three days) or its vehicle (day 7)..	39

### ARTIGO 2

<b>Figura 1</b> – Effect of reserpine on survival in WT N2 and BY200 worms.....	48
<b>Figura 2</b> – Effect of reserpine on the development of WT N2 worms .....	48
<b>Figura 3</b> – Effect of reserpine on locomotor rate on food of WT N2 worms and cat-2 loss-of-function mutants.....	49
<b>Figura 4</b> – Dopamine levels in WT N2 worms exposed to reserpine or vehicle throughout adulthood .....	49
<b>Figura 5</b> – Effect of reserpine on fluorescence intensity of CEP dopaminergic neurons in BY200 worms. ....	50
<b>Figura 6</b> – Effects of reserpine on CEP dopaminergic neuron morphology in BY200 worms.....	51
<b>Figura 7</b> – Effect of reserpine on <i>dat-1</i> gene and GFP expressions in BY200 worms.....	52
<b>Figura 8</b> – Survival of dopaminergic protein loss-of-function mutants exposed to reserpine.....	53
<b>Figura 9</b> – Effect of dopamine pretreatment (10mM/10min) on survival of WT N2 worms exposed to reserpine.....	54
<b>Figura 10</b> – Effect of reserpine on relative <i>Pgst-4::GFP</i> fluorescence in VP596 worms.....	55

### DADOS ADICIONAIS

<b>Figura 1</b> – Efeito do AG na atividade da monoaminoxidase (MAO) total (MAO-T), isoforma A (MAO-A) e isoforma B (MAO-B) .....	58
<b>Figura 2</b> – Imunoreatividade das proteínas TH (A), DAT (B) e Bcl-2 (C) em estriado de ratos tratados com reseprina (1mg/kg/dia, sc) durante 3 dias, seguido por tratamento com AG (13,5 mg/kg/dia, vo) por 3 dias .....	59

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

**Tabela 1** – Oxidative stress and antioxidant parameters in striatum and cortex of rats treated with reserpine (R, 1 mg/kg/day, s.c., during 3 days) or its vehicle followed by treatment with different doses of gallic acid (GA, 4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o.) or water for 3 consecutive days..... 40

**Tabela 2** – Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity (total and  $\alpha$ 1 subunit) in striatum and cortex of rats treated with reserpine (R, 1 mg/kg/day, s.c., during 3 days) or its vehicle followed by treatment with different doses of gallic acid (GA, 4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o.) or water for 3 consecutive days ..... 40

### ARTIGO 2

**Tabela 1** – Effects of reserpine on pharyngeal pumping, defecation time, egg production and egg laying of WT N2 worms ..... 49

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AG** – Ácido gálico
- AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- CAT** – Catalase
- CEP** - Cefálicos
- COMT** – Catecol-O-metil transferase
- CMTE** – Cadeia mitocondrial de transporte de elétrons
- DA** - Dopamina
- DAT** – Transportador de dopamina
- DCFH-DA** - Diclorofluoresceína
- DOPAC** – Ácido dihidroxifenilacético
- DP** – Doença de Parkinson
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- GABA** – Ácido gama-aminobutírico
- GFP** – Proteína verde fluorescente
- GPx** – Glutaciona-peroxidase
- GR** – Glutaciona redutase
- GSH** – Glutaciona reduzida
- GSSG** – Glutaciona oxidada
- HVA** – Ácido homovanílico
- L-DOPA** - L-di-hidroxifenilalanina
- MAO** – Monoaminoxidase
- MDA** - Malondialdeído
- MMVs** – Movimentos de mascar no vazio
- MPTP** - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroxipiridina
- ROD** – Densidade optica reativa
- SOD** – Superóxido dismutase
- SNC** – Sistema nervoso central
- TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico
- TVMs** – Transportador vesicular de monoaminas
- 4-HQ** – 4-hidroxiquinolina

**6- OHDA - 6-hidroxidopamina**



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Sistema Dopaminérgico</b> .....	14
<b>1.2 Movimentos Involuntários</b> .....	19
<b>1.3 Discinesia Orofacial induzida por Reserpina</b> .....	21
<b>1.4 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo</b> .....	23
<b>1.5 Ácido Gálico</b> .....	26
<b>1.6 <i>Caenorhabditis elegans</i></b> .....	27
1.6.1 Reserpina e <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	35
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	35
<b>3 RESULTADOS</b> .....	36
<b>3.1 Artigo 1 - Gallic acid decreases vacuuous chewing movements induced by reserpine in rats</b> .....	36
Abstract.....	37
Introduction.....	37
Material and Methods.....	38
Results .....	39
Discussion.....	39
Conclusion.....	41
References .....	41
<b>3.2 Artigo 2 - Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in <i>Caenorhabditis elegans</i></b> .....	43
Abstract.....	44
Introduction.....	44
Methods .....	45
Results .....	47
Discussion.....	51
References .....	54
<b>3.3 Dados adicionais</b> .....	57
Materiais e métodos.....	57
Resultados.....	58
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	70

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta tese.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos e dados adicionais, os quais se encontram no item **RESULTADOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Referências Bibliográficas, encontram-se nos artigos e nos dados adicionais e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO** encontram-se no final dessa tese, e apresentam as discussões e conclusões sobre os resultados contidos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema Dopaminérgico

A dopamina (DA, 3,4-dihidroxifeniletilamina) é uma catecolamina, assim como a epinefrina e a norepinefrina, que modula sinalizações sinápticas tanto em vias excitatórias quanto inibitórias (DANI & ZHOU, 2004; SEAMANS & YANG, 2004). No sistema nervoso central (SNC), ela é responsável por controlar e modular uma série de funções fisiológicas, como atividade locomotora, cognição, emoção, recompensa, sono, integração neuroendócrina e ingestão alimentar (BUIJS et al., 1984; STUHLIK et al., 2007). Perifericamente, ela é importante no controle dos sistemas neurovegetativos. Sabe-se que a atividade anormal do sistema dopaminérgico está relacionada a diversas doenças, como Parkinson (DP), Alzheimer, esquizofrenia, transtorno bipolar, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e síndrome de Tourette (MIYAMOTO et al., 2005; SCHULTZ, 2007). Determinadas regiões cerebrais envolvidas no desenvolvimento das desordens motoras apresentam elevadas quantidades de DA (por exemplo, o estriado apresenta em torno de 75% da concentração de DA cerebral (RANG et al., 2012)).

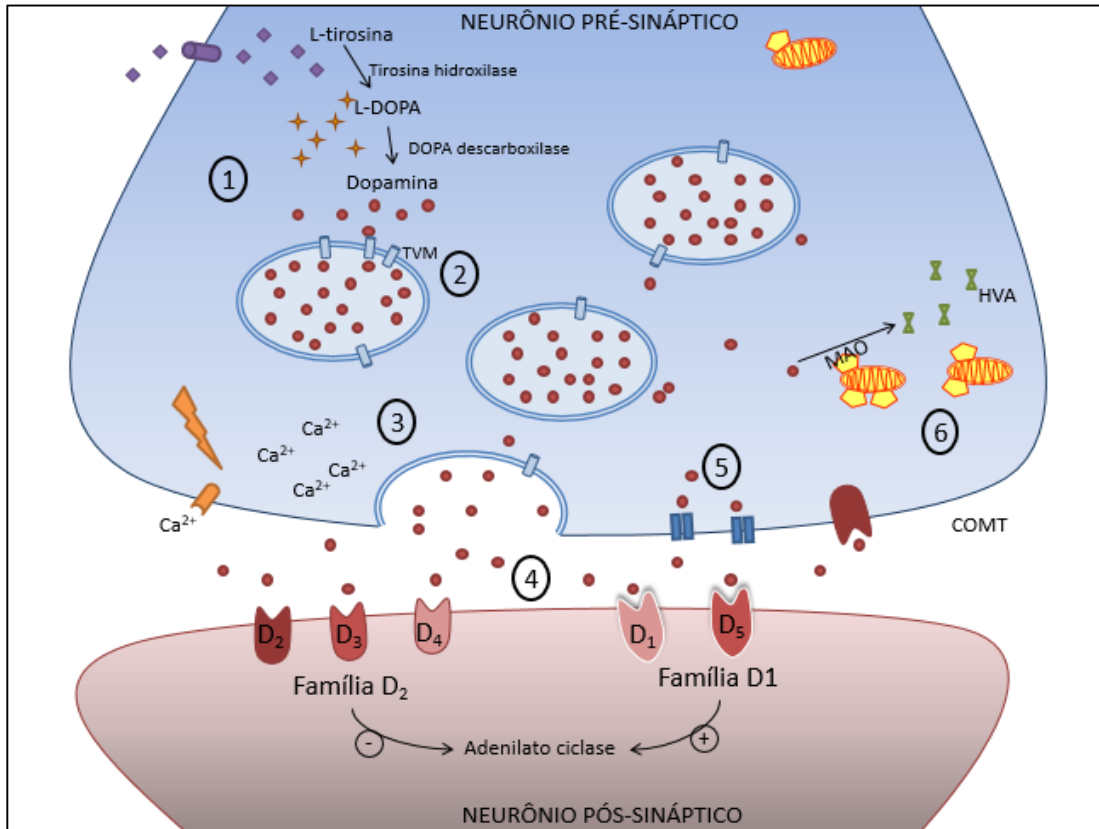
A síntese de DA inicia-se com a captação ativa do aminoácido L-tirosina para dentro do terminal sináptico (a L-tirosina pode ter origem da dieta ou provir do metabolismo da fenilalanina). Quando no citosol, a L-tirosina é transformada pela ação da enzima tirosina hidroxilase (etapa limitante) em L-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) e, posteriormente, a L-DOPA é convertida a DA por ação da L-DOPA descarboxilase (SIEGEL et al., 2005). A DA recém-sintetizada é então transportada do citoplasma para vesículas de estocagem especializadas via transportador vesicular de monoaminas (TVMs), prevenindo dessa forma sua degradação pela monoaminoxidase (MAO). Esse transportador é dependente de trifosfato de adenosina (ATP) e pode ter sua atividade inibida pelo alcalóide reserpina (MÉTZGER et al., 2002).

Em resposta a um estímulo nervoso, ocorre despolarização do terminal neuronal e abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. Conseqüentemente, as membranas das vesículas de armazenamento de DA se fundem com a membrana do terminal sináptico, causando liberação de neurotransmissor na fenda sináptica. Quando na fenda sináptica, a DA pode ter diferentes destinos: (1) agir em receptores pós e pré-sinápticos; (2) ser recaptada para

dentro do terminal pré-sináptico pelo transportador de DA (DAT) ou (3) ser metabolizada pela catecol-O-metil transferase (COMT).

Os receptores dopaminérgicos de mamíferos são metabotrópicos e classificados de acordo com suas características estruturais em tipo D<sub>1</sub> (subtipos D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>) ou D<sub>2</sub> (subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>). O primeiro tipo está acoplado à proteína G estimulatória (G<sub>s</sub>), logo a ativação desse receptor ativa a adenilato ciclase, eleva os níveis do mensageiro intermediário adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e, conseqüentemente, ativa a proteína cinase A. Já os receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> estão acoplados à proteína G inibitória (G<sub>i</sub>), logo, quando ativados, reduzem os níveis de AMPc celular, hiperpolarizando o neurônio (SIEGEL et al., 2005). Os receptores do tipo D<sub>2</sub> estão presentes tanto nos terminais pós-sinápticos como nos corpos celulares dos neurônios pré-sinápticos, e a ligação da DA nos receptores de neurônios pré-sinápticos tem efeito inibitório na síntese e liberação de DA (RANG et al., 2012).

O término da transmissão dopaminérgica ocorre principalmente através da retirada da DA da fenda sináptica por recaptção (GAINETDINOV et al., 1998). Essa atividade é exercida pelo DAT (AMARA & KUHAR, 1993), uma proteína carreadora transmembrana de aproximadamente 80 kDa (GIROS & CARON, 1993; PATEL et al., 1992). Como consequência de sua ação, o DAT também é responsável por controlar a disponibilidade extracelular da DA (GAINETDINOV et al., 1998). Camundongos sem DAT exibem profundas alterações neuroquímicas incluindo elevados níveis extracelulares de DA, retardo na retirada da DA da fenda sináptica e diminuição dos níveis intraneuronais de DA (GIROS et al., 1996). Quanto ao comportamento, esses camundongos apresentam hiperatividade, problemas cognitivos e respostas psicoestimulantes alteradas (GAINETDINOV et al., 2002; HIRONAKA et al., 2004; MEDVEDEV et al., 2005; POWELL et al., 2004; RODRIGUIZ et al., 2004; TILLERSON et al., 2006). Além disso, a atividade do DAT parece ter relação com movimentos involuntários, uma vez que seus níveis encontram-se reduzidos em pacientes com discinesia tardia (YODER et al., 2004) ou DP (INNIS et al., 1993). Em adição aos trabalhos com pacientes, trabalhos com animais experimentais relatam que a reserpina tem ação no DAT (JI et al., 2009; MÉTZGER et al., 2002), causando redução de 51% na captação de DA em estriado de ratos (GORDON et al., 1996). Também a captação de DA em estriado de ratos tratados cronicamente com haloperidol ou flufenazina, antipsicóticos típicos conhecidos por causarem elevada prevalência de discinesia tardia, está inversamente relacionada com o desenvolvimento de discinesia orofacial (denominação para os modelos de discinesia tardia em roedores) (FACHINETTO et al., 2007a, b).



**Figura 1.** Terminal de um neurônio dopaminérgico, mostrando a síntese da dopamina (DA) a partir da L-tirosina (1), sua entrada nas vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas (TVM) e armazenamento (2), liberação na fenda sináptica (3), ação em receptores dopaminérgicos (4), captura da DA extracelular pelo transportador de dopamina (DAT) (5), e metabolismo da DA pela monoamino oxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT) gerando seus principais metabólitos: ácido homovanílico (HVA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e pequenas quantidades de 3-metoxitiramina (6). Adaptado de Pereira & Bel (2010).

Uma enzima que é essencial no funcionamento celular e do DAT é a  $Na^+,K^+$ -ATPase (LESTER et al., 1994). Essa enzima transmembrana é responsável pelo transporte ativo de íons de sódio e potássio através da membrana celular em praticamente todos os tecidos (SKOU & ESMANN, 1992). O gradiente iônico formado por essa enzima nas membranas celulares é necessário para o transporte de nutrientes e aminoácidos para dentro da célula, equilíbrio osmótico, controle do volume celular, manutenção e restauração do potencial de membrana em células excitáveis (GEERING, 1997; PAVLOV & SOKOLOV, 2000), bem como liberação e recaptção de neurotransmissores no SNC (STAHL & HARRIS, 1986). Logo, alterações na atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase podem afetar a sinalização celular, a atividade neural e todo o comportamento animal (JAMME et al., 1995; LEES et al., 1990; LI & STYS, 2001). Pouco se sabe sobre a relação da atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase com o desenvolvimento de movimentos involuntários. Nesse contexto, Pereira et al. (2011) demonstrou que a atividade da  $Na^+,K^+$ -

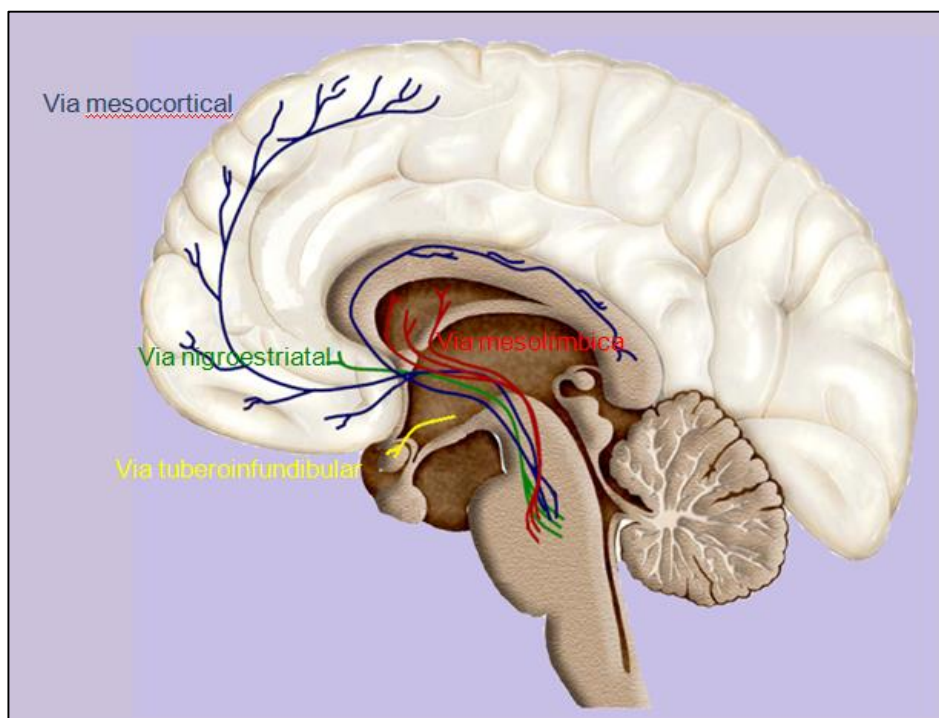
ATPase na *substantia nigra* está negativamente relacionada com a frequência de movimentos de mascar no vazio (MMVs) induzidos por reserpina em ratos.

Duas enzimas, em especial, controlam a metabolização da DA: a MAO e a COMT. A MAO se localiza na membrana mitocondrial externa de neurônios monoaminérgicos e glia, e se apresenta em duas isoformas (tipo A e tipo B) (SIEGEL et al., 2005). Nos neurônios dopaminérgicos de humanos, é preferencialmente a MAO-B que metaboliza a DA presente no terminal sináptico e não armazenada em vesículas (SIEGEL et al., 2005) (já em roedores é preferencialmente a MAO-A), mas em condições de elevadas concentrações de DA ambas isoformas metabolizam a DA (YOUDIM & BAKHLE, 2006; YOUDIM et al., 2006). A MAO converte a DA em sua forma aldeído, a qual é rapidamente metabolizada pela aldeído desidrogenase. Já a COMT cataboliza a parte da DA que se difunde na fenda sináptica ou é liberada da forma não clássica, chamada transmissão por volume (RICE, 2000). Como resultado dessas reações formam-se os principais metabólitos da DA: ácido homovanílico (HVA), ácido di-hidroxfenilacético (DOPAC), e pequenas quantidades de 3-metoxidopamina. O HVA é o metabólito majoritário da DA em humanos e *C. elegans* (COOPER et al., 2003; WINTLE & TOL, 2001), enquanto que em roedores é o DOPAC (COOPER et al., 2003).

A DA distribui-se no encéfalo de mamíferos em 4 principais vias: mesolímbica, mesocortical, tuberoinfundibular e nigroestriatal (DAHLSTROM & FUXE, 1964) (ver figura 2). Neurônios dopaminérgicos que partem da *substantia nigra*, assim denominada pela aparência escura quando vista a olho nu em secções anatômicas, e terminam no estriado formam a via nigroestriatal. Essa via está envolvida com o controle da atividade motora voluntária e contém cerca de 75% da DA presente no cérebro. As alterações motoras estão muito relacionadas com alterações na via nigroestriatal; como exemplo, ocorre deficiência de DA nessa região em pacientes com DP (RANG et al., 2012) e os sintomas da DP não aparecem até que a maioria (aproximadamente 80%) dos neurônios da via nigroestriatal tenham sido degenerados. Além disso, antipsicóticos realizam sua ação farmacológica via bloqueio de receptores dopaminérgicos do tipo D2 da via mesolímbica, mas podem levar ao desenvolvimento de movimentos involuntários ao bloquear também receptores D2 da via nigroestriatal (RANG et al., 2012).

As vias mesolímbica e mesocortical são formadas por projeções dopaminérgicas que partem da área tegmentar ventral e terminam em regiões límbicas sub-corticais (amígdala, núcleo accumbens e septo palúcido) ou corticais (córtex pré-frontal medial, giro do cíngulo, córtex entorrinal, tubérculo olfatório e córtex piriforme). Essas vias têm relação com os

sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012) - sendo a via mesocortical associada aos efeitos terapêuticos dos antipsicóticos (ELLENBROEK, 1993) - além de aprendizado e memória. Já a via tuberoinfundibular projeta neurônios do núcleo hipotalâmico para a glândula pituitária posterior no infundíbulo, onde a DA inibe a secreção do hormônio prolactina, importante na reprodução e ciclo reprodutivo. Logo, a inibição da via tuberoinfundibular em consequência ao uso de antipsicóticos pode causar ginecomastia e galactorrêia no paciente como efeitos colaterais (ELLENBROEK, 1993; GRAEFF & GUIMARÃES, 2012).



**Figura 2.** Principais vias dopaminérgicas do encéfalo de humanos. As vias mesolímbica e mesocortical são formadas por projeções dopaminérgicas que partem da área tegmentar ventral e terminam em regiões límbicas sub-corticais ou corticais; a via tuberoinfundibular projeta neurônios do núcleo hipotalâmico para a glândula pituitária posterior; a via nigroestriatal projeta neurônios da *substantia nigra* para o estriado. Figura adaptada de <http://www.esencialnatura.com/wp-content/uploads/2014/12/dopamina.jpg>

Sabe-se que as regiões cerebrais ricas em DA são particularmente susceptíveis a danos oxidativos. Isso se deve ao fato dessas regiões serem locais de intensa atividade da MAO, a qual gera espécies reativas de oxigênio (EROs) como sub-produtos de sua atividade metabólica (ALUF et al., 2011). Além disso, a própria DA é conhecida por ser uma molécula naturalmente reativa - seus grupamentos catecólicos podem se oxidar gerando dopa-quinonas altamente reativas (ALUF et al., 2011). Quando a quantidade de espécies reativas supera a capacidade do

sistema antioxidante do organismo de neutralizá-las, tem-se uma condição denominada estresse oxidativo (HALLIWELL et al., 2014). Como resultado, esse excesso de espécies reativas pode danificar tanto lipídeos, quanto proteínas e DNA (ANDREASEN & JORGENSEN, 2000; JOMOVA & VALKO, 2011; LOHR, 1991; SISTRUNK et al., 2007), representando risco ao sistema nervoso, que tem capacidade limitada de regenerar-se ou ser substituído. Além disso, sabe-se que ainda não existe tratamento efetivo nem cura para as principais doenças neurodegenerativas da população nem para danos provenientes de traumatismo no SNC (ANTONELLI et al., 2012). Alguns trabalhos mostram que inibidores da MAO podem contribuir para a redução do dano oxidativo (YOUDIM & BAKHLE, 2006; YUDIM et al., 2006), mas mais estudos nessa área são necessários.

## 1.2 Movimentos Involuntários

Conforme discutido, a via dopaminérgica nigroestriatal participa do controle motor e alterações nessa via podem levar ao desenvolvimento de movimentos involuntários (RANG et al., 2012). Os movimentos involuntários estão presentes em um vasto grupo de doenças, dentre elas destaca-se a DP, e também de condições farmacológicas, como é o caso da discinesia tardia, um distúrbio resultante do tratamento prolongado com antipsicóticos típicos (ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; LOTHARIUS & BRUNDIN, 2002; THOMAS & BEAL, 2007). Essas doenças são particularmente importantes devido à elevada prevalência na população. Por exemplo, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo (a primeira é a doença de Alzheimer), ocorrendo em aproximadamente 1-2% dos indivíduos acima de 65 anos de idade (ALVES et al., 2008). Já a prevalência da discinesia tardia varia de 23,4 a 43 % entre os pacientes que fazem uso crônico de antipsicóticos (HALLIDAY et al., 2002; KANE et al., 1986, PATTERSON et al., 2005), e esse valor pode variar de acordo com a idade e o gênero do paciente, além da classe de antipsicótico em uso (YASSA & JESTE, 1992).

A DP é uma doença neurodegenerativa grave, crônica e progressiva, caracterizada por tremor de repouso, espasticidade e incapacidade de iniciar movimentos, bradicinesia, instabilidade postural e rigidez muscular. Sabe-se que as alterações motoras observadas na DP ocorrem após perda progressiva e irreversível de 80-90% dos neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta*, acompanhada por uma consequente redução expressiva nos níveis de DA no estriado (LANG & LOZANO, 1998). Os mecanismos responsáveis pela perda



dos neurônios dopaminérgicos nigrais permanecem obscuros. Vários experimentos reportam a relação de diversos mecanismos patológicos incluindo o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação e apoptose (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; THOMAS et al., 2008).

Já a discinesia tardia é um efeito colateral grave resultante do uso prolongado de antipsicóticos típicos. Ela consiste uma síndrome hiperkinética com movimentos involuntários anormais coreiformes, atetóides ou rítmicos, geralmente acometendo face, boca e língua (tipo orofacial), embora membros superiores, inferiores e tronco também possam ser acometidos (KANE, 1995). Dentre os movimentos orofaciais destacam-se mastigação no vazio, protrusão de língua, estalido de lábios, movimentos de franzir e de piscar os olhos. A discinesia tardia geralmente tem início tardio (após meses de tratamento com antipsicóticos) e sua gravidade pode variar ao longo do tempo. Seu aspecto mais grave é que pode persistir por meses ou anos após o término do tratamento com antipsicótico, e é irreversível para a maioria dos pacientes (CASEY, 1985; CRANE, 1973; GLAZER et al., 1990; JESTE et al., 1979).

Algumas hipóteses neuroquímicas tentam explicar o mecanismo de desenvolvimento da discinesia tardia. Dentre elas, a hipótese da supersensibilidade dopaminérgica sugere que em resposta ao bloqueio crônico dos receptores dopaminérgicos da via nigroestriatal pelos antipsicóticos, ocorre um aumento no número e na sensibilidade dos receptores dopaminérgicos e consequente estado hiperdopaminérgico e manifestações clínicas (BURT et al., 1977; KLAWANS & RUBOVITS, 1972; RUBINSTEIN et al., 1990). Já na hipótese dos radicais livres, acredita-se que devido ao bloqueio de receptores dopaminérgicos pré-sinápticos estriatais, ocorre um aumento secundário da síntese e, consequentemente, dos níveis extracelulares de DA (ANDREASEN & JORGENSEN, 2000; LOHR, 1991), a qual pode gerar EROs por autooxidar-se ou sofrer metabolismo via aumento da atividade da enzima MAO após recaptação (ANDREASEN & JORGENSEN, 2000; LOHR, 1991). Apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia que leva à neurodegeneração e aos movimentos involuntários, os mecanismos moleculares pelos quais isso ocorre são pobremente entendidos.

Como auxiliar no entendimento da fisiopatologia dos movimentos involuntários bem como para o estudo de possíveis tratamentos, vários modelos animais são utilizados. Como exemplo, vários dos fenótipos da DP podem ser mimetizados em modelos experimentais (BOVE et al., 2005), como através da administração de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidroxipiridina (MPTP) (JENNER, 2008), rotenona, paraquat ou reserpina (SODERSTROM et al., 2009). Há ainda modelos genéticos de parkinsonismo induzidos em

roedores pela deficiência ou superexpressão de  $\alpha$ -sinucleína (LOTHARIUS & BRUNDIN, 2002). Os modelos animais mais comumente utilizados no estudo da discinesia tardia são os modelos agudos/sub-crônicos induzidos por neurolépticos e o modelo de discinesia orofacial induzido por reserpina (ANDREASSEN et al., 2003; JICHA & SALAMONE, 1991; TREVIZOL et al., 2011). Como visto, o modelo animal de movimentos involuntários induzidos por reserpina é muito importante tanto nos estudos da DP quanto da discinesia tardia.

### 1.3 Discinesia Orofacial induzida por Reserpina

A reserpina é um alcalóide isolado das raízes do arbusto *Rauwolfia serpentina* da família das *Apocynaceae*, nativo da Índia. Esse composto bloqueia irreversivelmente o TVMs, uma vez que apresenta grande afinidade por ele (RUDNICK et al., 1990). Na clínica, o uso de reserpina é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de emergências hipertensivas graves e como antipsicótico (BIGELOW, 2006; FOYE et al., 1995; YANIV & BACHRACH, 2005). Entretanto, a reserpina é pouco utilizada para esses fins devido aos efeitos colaterais: 15% dos pacientes apresentam depressão e DP (BAUMEISTER et al., 2003; KANDEL, 1991), e também podem desenvolver discinesia tardia (SCHONECKER, 1985; UHRBRAND & FAURBYE, 1960).

Como consequência do bloqueio do TVMs, a reserpina impede o armazenamento de monoaminas em vesículas do terminal pré-sináptico levando a depleção das mesmas nas terminações nervosas (HENRY et al., 1998), mimetizando as concentrações cerebrais de DA observadas na DP. Elverfors & Nissbrandt (1991) mostraram que após única administração subcutânea de 5 mg/Kg de reserpina, os ratos apresentaram uma redução dos níveis de DA a 2% no estriado e a 17% na *substantia nigra* em relação às concentrações presentes nos animais controle. Sussman et al. (1997) mostrou que 3 dias após a administração de 1 mg/Kg de reserpina em ratos, os níveis de DA no estriado estão reduzidos em relação ao controle (74%), e os níveis dos principais metabólitos da DA, DOPAC e HVA, estão aumentados (32 e 38%, respectivamente). Apesar dos níveis de DA retornarem a aproximadamente 30% 24 horas após a administração de reserpina, os níveis estriatais persistem abaixo de 95% (HEERINGA & ABERCROMBIE, 1995).

Em roedores, os efeitos motores induzidos por reserpina podem ser evidenciados após tratamentos agudos com doses altas (1 ou 5 mg/kg, sc), ou gradualmente após tratamento crônico com doses baixas. Dentre os efeitos motores induzidos por esses tratamentos com

reserpina estão: aumento na frequência de MMVs e de protrusões de língua, do tempo de tremor facial e de catalepsia (ABÍLIO et al., 2004; BARCELOS et al., 2010; BURGER et al., 2003; BUSANELLO et al., 2011; DUTRA et al., 2002; FARIA et al., 2005; FERNANDES et al., 2012; NEISEWANDER et al., 1994; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2008, 2009; TREVIZOL et al., 2011). Também pode ser observado hipolocomoção, tremores e rigidez muscular (BASKIN & SALAMONE, 1993; COLPAERT, 1987; KAUR & STARR, 1995; NAKAGAWA et al., 1997; SALAMONE & BASKIN, 1996; SANTOS et al., 2013; WILLIAMS & PIRCH, 1974), assim como acinesia (DOLPHIN et al., 1976), letargia, anedonia (SKALISZ et al., 2002), depressão (LEE et al., 2012), dor (ARORA et al., 2011) e parkinsonismo (DUTY & JENNER, 2011). Tratamento crônico com baixas doses de reserpina causa início tardio de discinesia orofacial, a qual é persistente após o término do uso (NEISEWANDER et al., 1994). Já, quando se utilizam administrações agudas de reserpina, o parkinsonismo farmacológico é temporário (DUTY & JENNER, 2011; HEERINGA & ABERCROMBIE, 1995; STEINPREIS & SALAMONE 1993) o que não condiz com a progressiva degeneração da via nigroestriatal da DP. A idade aumenta a persistência e a severidade dos MMVs induzidos por reserpina em roedores (BERGAMO et al., 1997; WOLFARTH & OSSOWSKA, 1989).

Trabalhos prévios sugerem que a discinesia orofacial, com tremores da musculatura facial, MMVs e protrusões de língua (NEISEWANDER et al., 1991a, b, 1994), induzida por reserpina seja um modelo de discinesia tardia (ABÍLIO et al., 2003, 2004; BERGAMO et al., 1997; NEISEWANDER et al., 1991a, b, 1994; VITAL et al., 1997). Do contrário, alguns autores consideram esses movimentos induzidos por reserpina como parkinsonismo (COLPAERT, 1987; DAWSON et al., 2000; MENZAGHI et al., 1997; SALAMONE et al., 2008; SALAMONE & BASKIN, 1996), pois ela interfere no armazenamento de catecolaminas nas vesículas sinápticas resultando em depleção das mesmas (CARLSSON, 1975) e induz hipolocomoção e rigidez muscular. Salamone e Baskin (1996) sugerem que a administração aguda de reserpina seguida da administração de uma dose baixa de apomorfina pode induzir movimentos de mandíbula como modelo de tremor parkinsoniano. Já alguns autores reportam que discinesia tardia e o parkinsonismo podem ocorrer ao mesmo tempo (FANN & LAKE, 1974; GUNNE & ANDRÉN, 1993). Dutra et al. (2002) sugerem que reserpina pode ser considerada tanto um modelo de discinesia tardia quanto de DP, o que irá determinar será o tratamento adotado, principalmente a dose e o tempo entre cada administração e observação

dos movimentos. Apesar das divergências, esse modelo é muito importante no entendimento da fisiopatologia dos movimentos involuntários.

Dentre as vantagens, a reserpina apresenta baixa toxicidade em relação às outras drogas, reduzindo o risco de contaminação de quem a manipula e o número de animais que morrem após administração. Por exemplo, Ferro et al. (2005) mostrou que os modelos que utilizam MPTP e 6-OHDA causam redução de peso e morte de 20% dos animais experimentais, mortalidade que não é observada ao se utilizar reserpina (FERNANDES et al., 2012). Além disso, as principais formas de administração da reserpina em animais experimentais são subcutânea ou intraperitoneal, logo administrações intracerebroventriculares não são necessárias.

Inicialmente, o modelo da reserpina demonstrou a eficácia terapêutica da L-DOPA (CARLSSON et al. 1957), fármaco que continua até hoje considerado como padrão de referência no tratamento da DP. Outros trabalhos também mostram o papel do sistema dopaminérgico no modelo de discinesia orofacial induzida por reserpina. Como exemplo, MMVs induzidos por reserpina foram parcialmente revertidos pela administração de espiroperidol, um antagonista de receptores dopaminérgicos D2 (NEISEWANDER et al., 1991a), e exacerbados pela administração de agonistas dopaminérgicos, como anfetamina, ou lesões nigroestriadas causadas por 6-OHDA (NEISEWANDER et al., 1996). Acredita-se que a reserpina cause MMVs principalmente por interferência no metabolismo da DA, e subsequente neurotoxicidade em estruturas cerebrais que participam do controle dos movimentos (como é o caso do estriado) (ALUF et al., 2011). Contudo, os detalhes de como isso acontece ainda não estão completamente entendidos. Há um consenso de que se os mecanismos pelos quais a reserpina induz movimentos involuntários forem esclarecidos, pode-se ter mais meios de estudar e entender a fisiopatologia da DP, da discinesia tardia e de outras enfermidades com movimentos involuntários, assim como de buscar formas de tratamento com alvo definido.

#### **1.4 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo**

Devido ao fato do estado funcional de uma célula ser intimamente relacionado com o seu ambiente redox, o equilíbrio entre a geração de EROs e as defesas antioxidantes é crítico para a saúde e a sobrevivência de organismos (SCHAFER & BUETTNER, 2001). Quando a geração de EROs supera a capacidade antioxidante do organismo, tem-se uma condição denominada estresse oxidativo (HALLIWELL et al., 2014). Durante o estresse oxidativo, EROs

podem causar danos às células por reagirem com componentes celulares, tais como DNA, proteínas e lipídeos (KOHEN & NYSKA, 2002; KONAT, 2003).

A classe de espécies reativas mais representativa em sistemas vivos é a das EROs - essas possuem oxigênio ou no centro da molécula ou na forma de íon ou peróxidos. Como exemplos de EROs têm-se o ânion superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), alcóxila ( $RO\cdot$ ), peróxilas ( $ROO\cdot$ , como peroxinitrito,  $ONOO^-$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (GIROTTI & KRISKA, 2004) e ozônio (COOPER et al., 2010). Já as principais espécies reativas de nitrogênio em sistemas vivos são o óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) e dióxido de nitrogênio. Muitas dessas moléculas possuem átomos ou grupos de átomos com elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, ou seja, são radicais livres (HALLIWELL, 2007).

Uma das principais formas endógenas de geração de EROs se dá durante o metabolismo aeróbico, através de reações de redução/oxidação (redox) na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (CMTE) (DAVIES et al., 2000). Como exemplo, cerca de 1-4% do oxigênio reduzido durante o funcionamento da CMTE acaba formando ânion superóxido (MULLER et al., 2004). Sob condições de estresse celular e depleção de ATP, o excesso do radical superóxido na presença de ferro livre ( $Fe^{II}$ ) pode favorecer a geração de radical hidroxila, o qual é altamente reativo (LENAZ et al., 1999; LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994). Outros metais de transição, como cobre e manganês, também podem reagir com o ferro II favorecendo a geração de radical hidroxila. As EROs também são geradas em grandes quantidades nos peroxissomos (oxidases peroxissomais são responsáveis pela formação de aproximadamente 35% de todo o  $H_2O_2$  formado no fígado de ratos) (BOVERIS et al., 1972) e em células fagocíticas (grandes quantidades de ânion superóxido, ácido hipocloroso  $HOCl$  e  $H_2O_2$  são formadas durante o processo inflamatório) (KLEBANOFF, 1980; LAMBETH, 2004). Além disso, as EROs também podem ter sua produção aumentada frente a agentes exógenos pró-oxidantes como radiação ultra-violeta, produtos ambientais tóxicos, fumaça de cigarro, e outros produtos químicos carcinogênicos (BURKE & WEI, 2009).

Quantidades fisiológicas de EROs são necessárias e benéficas durante diversos processos fisiológicos, como na destruição de patógenos invasores, protegendo as células de infecções (HALLIWELL, 2006; VALKO et al., 2007). As EROs também desempenham papel de segundos mensageiros na regulação do funcionamento das células cardíaca, vascular e nervosa (GRIENDLING et al, 2000; VALKO et al., 2007) e estão envolvidas na regulação da

concentração de cálcio intracelular, na fosforilação de proteínas e/ou fosforilação e ativação de fatores de transcrição.

Os níveis celulares das EROs são constantemente controlados por defesas antioxidantes com o intuito de manter a homeostase celular e proteger as células de danos. Essas defesas antioxidantes incluem enzimas e moléculas em geral de baixo peso molecular. São exemplos de enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD, a forma MnSOD é mitocondrial e a CUZnSOD é citosólica), a glutaciona-peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (REDDY e YAO, 1996). Essas enzimas atuam em conjunto na via metabólica de EROs. O ânion superóxido é primeiro convertido pela SOD em peróxido de hidrogênio, que é então decomposto em água e oxigênio pela CAT, prevenindo assim a formação do radical hidroxila. Além da CAT, a GPx também pode reduzir  $H_2O_2$ , mas para isso utiliza glutaciona reduzida (GSH) como doador de elétrons (VALKO et al., 2004). A glutaciona oxidada (GSSG) é depois reduzida a GSH pela glutaciona redutase (GR). Já a glutaciona-S-transferase catalisa a conjugação de GSH a centros eletrofílicos sobre uma ampla variedade de substratos, por meio de um grupo sulfidrílica, o que diminui os níveis de hidroperóxido (VENDEMIÁLE et al., 1999). A GSH, o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), os carotenóides e a coenzima Q, servem como neutralizadores de espécies reativas e são descritos como agentes redutores não enzimáticos. Dados da literatura demonstram que animais com MMVs apresentam alteração em parâmetros de estresse oxidativo no estriado (ABÍLIO et al., 2003; BILSKA et al., 2007; BURGER et al., 2003; FARIA et al., 2005; FERNANDES et al., 2012; NAIDU et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2008, 2009) e redução das defesas antioxidantes bem como da concentração de GSH (ABÍLIO et al., 2003; ALUF et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2008).

A oxidação de proteínas por EROs pode levar à perda de grupos sulfidrílica e a modificações de aminoácidos, o que tornam as proteínas não-funcionais (LOCKWOOD, 2000; STATDMAN & LEVINE, 2003). Como exemplo, a  $Na^+,K^+$ -ATPase e o DAT têm suas atividades diminuídas quando as EROs reagem com seus grupamentos sulfidrílicos (HASHIMOTO et al., 2004; HUANG et al., 2003; MOREL et al., 1998). As EROs também podem causar dano peroxidativo a lipídeos, como lipídeos da membrana da célula ou a lipídeos das membranas de organelas celulares (HORTON & FAIRHURST, 1987), alterando a fluidez e permeabilidade das mesmas (REDDY & YAO, 1996). Os hidroperóxidos formados durante a oxidação de membranas podem decompor-se a espécies tóxicas tais como malondialdeído (MDA), acroleína e 4-hidroxi-2-nonenal (BENEDETTI et al., 1980; ESTERBAUER et al., 1991), ou formar isoprostanos (YIN & PORTER, 2005).

O cérebro é particularmente vulnerável a danos oxidativos por várias razões (BEAL, 1995; FLOYD, 1999; JENNER, 1994; LOHR, 1991). Primeiro, ele consome muita energia, utiliza cerca de 20% do oxigênio disponível no sangue apesar de ser apenas 2% do peso corporal (CLARKE & SOKOLOFF, 1999). Segundo, o cérebro contém uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, os quais podem ser oxidados. Além disso, várias regiões cerebrais envolvidas na função motora, como os núcleos da base, são ricos em metais de transição favorecendo a reação de Fenton (WOLOZIN & GOLTS, 2002). Lohr et al. (1990) mostrou que pacientes com discinesia tardia apresentam elevados níveis de marcadores de peroxidação lipídica, como das substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico (TBARS) e de dienos conjugados, no fluído cérebro-espinhal comparado aos pacientes que não possuem discinesia tardia. Além disso, existe uma correlação positiva entre dienos conjugados e escores na escala de movimentos involuntários (Abnormal Involuntary Movement Scale, AIMS) (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 1976; SCHOOLER & KANE, 1982). Peet et al. (1993) observou correlação positiva também entre a severidade da discinesia tardia e níveis de TBARS plasmáticos.

O estresse oxidativo é cada vez mais implicado na etiologia de diversas doenças humanas, incluindo as doenças cardiovasculares, a isquemia/reperfusão, doenças neurodegenerativas, doença pulmonar, e mesmo durante o envelhecimento normal (BERLINER & WATSON, 2005; HALLIWELL, 2000; VALKO et al., 2004). Evidências diretas, no entanto, para a associação entre o estresse oxidativo e doença tem sido muitas vezes inexistente. Em muitos casos, as técnicas de análise carecem de falta de sensibilidade e especificidade, especialmente quando usadas para avaliar o estado de estresse oxidativo *in vivo* (MILNE et al., 2008; MORROW et al., 2002). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que vários antioxidantes naturais podem minimizar muitos dos movimentos involuntários induzidos por reserpina em ratos (BARCELOS et al., 2011; BUSANELLO et al., 2011; FARIA et al., 2005; PEREIRA et al., 2011; TREVIZOL et al., 2011) assim como em outros modelos animais de movimentos involuntários (BARCELOS et al., 2010; BISHNOI et al., 2008; BUSANELLO et al., 2012; NAIDU et al., 2003; SACHDEV et al., 1999; TREVIZOL et al., 2011).

## 1.5 Ácido Gálico

O ácido gálico (AG, ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um composto natural presente em abundância em vários alimentos, como no vinho tinto, no chá verde, na casca de romã e nas uvas (ABU-AMSHA et al., 2001; HO et al., 1992). Ele é um cristal amarelo-claro de massa molecular 170,12 g/mol, ponto de fusão de 250°C e solubilidade na água de 1,1% a 20°C (POLEWSKI et al., 2002). Esse composto é descrito como um potente antioxidante capaz de neutralizar EROs (KIM, 2007; POLEWSKI et al., 2002) e de quelar Fe (II) (ANDJELKOVICA et al., 2006). O AG também apresenta atividade antialérgica, anti-inflamatória (KROES et al., 1992), antimutagênica (GICHNER, 1987), anticarcinogênica (GALI et al., 1991; HAYATSU et al., 1988; INOUE et al., 1995; SINGLETON, 1981; STICH & ROSIN, 1984) e é capaz de induzir apoptose em algumas linhagens de células tumorais (INOUE et al., 1994; KAWADA et al., 2001; SERRANO et al., 1998) por mecanismos que incluem: ativação de ataxia telangiectasia mutante cinase, inibição de ribonucleotídeo redutase, inibição cicloxigenase-2, depleção de GSH, inibição da UDP-glicose desidrogenase e indução de apoptose (revisão de VERMA et al., 2013). Apesar da seletiva citotoxicidade contra células tumorais, o AG apresenta baixa toxicidade frente a cultura de células normais (CHIA et al., 2010) e ratos (DL50 = 5g/kg) (SHAHRZAD et al., 2001).

Os efeitos benéficos do tratamento com AG podem ser vistos em diversos trabalhos. Seu potencial antioxidante e anti-apoptótico são mostrados por Pal et al. (2010), onde o AG preveniu o desenvolvimento de úlceras gástricas por evitar disfunções mitocondriais, e a ativação das caspases 3 e 9. Além disso, um estudo prévio do nosso grupo mostrou que o AG protege ratos tratados com chumbo de danos locomotores e oxidativos em cérebro (RECKZIEGEL et al., 2011). Outro trabalho mostra que o chá das cascas da noz pecã (*Carya illinoensis*), o qual é rico em AG, foi capaz de prevenir e de tratar movimentos involuntários induzidos por reserpina em ratos (TREVIZOL et al., 2011). Além desses resultados, Mansouri et al. (2013) observaram os efeitos neuroprotetores do AG no modelo da 6-OHDA. Logo, o AG pode ser benéfico no tratamento de movimentos involuntários, mas essa propriedade ainda não foi avaliada experimentalmente no modelo de discinesia orofacial induzida por reserpina.

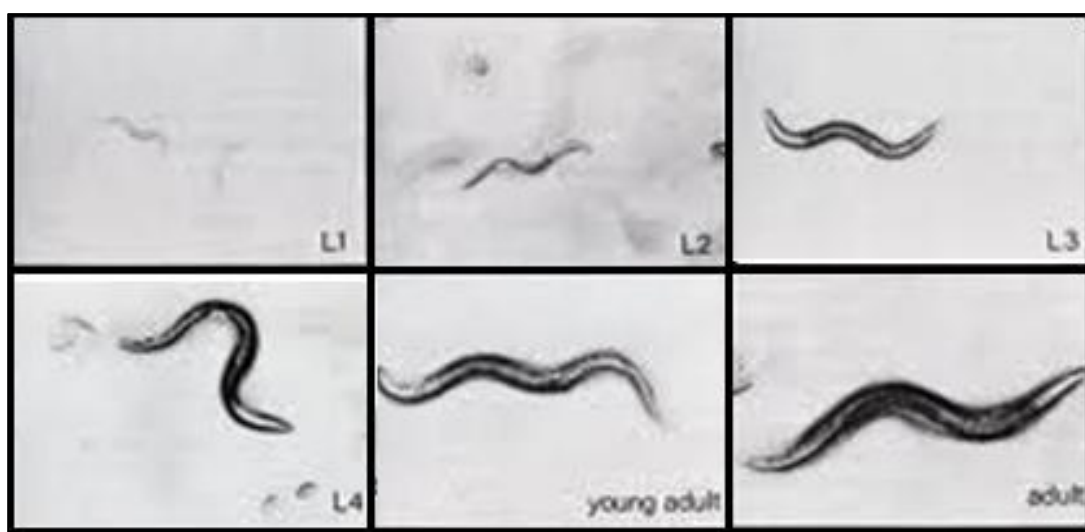
## **1.6 *Caenorhabditis elegans***

É crescente a necessidade de se desenvolver métodos alternativos confiáveis ao uso de animais vertebrados em pesquisa. As razões para isso são diversas, como éticas, econômicas e científicas (FERREIRA et al., 2014). Nesse contexto, estudos com *Caenorhabditis elegans* têm



mostrado resultados promissores. *Caenorhabditis elegans* (Caeno = recente; rhabditis = bastão; elegans = elegante) é um nematóide terrestre de vida livre. Ele pode ser encontrado em solos de várias partes do mundo e em frutas em decomposição, uma vez que sua alimentação é baseada em micro-organismos, principalmente bactérias. Seu cultivo em laboratório é possível utilizando placas contendo ágar e *Escherichia coli* como alimento (SULSTON & HORVITZ, 1977).

Esse organismo foi inicialmente utilizado na pesquisa científica por Sydney Brenner no ano de 1963, resolvendo, dessa forma, problemas tanto práticos quanto éticos vivenciados pela área. Como demonstração do mérito e da grandeza de seu trabalho, no ano de 2002, Brenner recebeu o prêmio Nobel (BRENNER, 1974), junto com Robert Horvitz, que descobriu o mecanismo de morte celular programada, e John Sulston, que definiu as linhagens celulares e constituiu um mapa físico do genoma de *C. elegans* (SULSTON & HORVITZ, 1977). As características favoráveis e os avanços no conhecimento da biologia nos últimos 30 anos fazem com que o *C. elegans* seja cada vez melhor visto pela comunidade científica como poderoso instrumento de estudo.



**Figura 3.** *C. elegans* em diferentes fases de desenvolvimento. O verme apresenta 4 estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), seguido da fase de adulto jovem e adulto (verme com ovos).

Dentre as vantagens da utilização desse modelo animal está seu tamanho pequeno (o verme adulto possui 1,3 mm de comprimento) e rápido ciclo de vida (após 3 dias o embrião atinge a fase adulta e está apto para reprodução), o que reduz custos e facilita a sua manutenção em laboratório (uma placa de petry de 100 mm de diâmetro pode acomodar milhares de vermes)

(BYERLY et al., 1976 ; WOOD, 1988). O ciclo de vida desse nematóide é composto por uma fase embrionária seguida de quatro estágios larvais (L1-L4) e da fase adulta (ver figura 3). O adulto coloca ovos por cerca de quatro dias e vive aproximadamente 15 dias (em condições normais, quando em presença de comida e temperatura próxima de 20°C) (WOOD, 1988). Os *C. elegans* são hermafroditas protândricos que se autofecundam, o que torna fácil a manutenção de mutações gênicas. Cada verme é capaz de gerar aproximadamente 300 progenitores. Também são encontrados indivíduos machos, mas a frequência é bastante baixa (cerca de 0,1% da população). Quando em condições de estresse (como falta de comida e/ou temperaturas extremas), o *C. elegans* apresenta-se na forma de resistência *dauer*, a qual possui metabolismo desacelerado e não se alimenta (WOOD, 1988). *Dauer* é um verme em estágio larval L3 que pode sobreviver por mais de 3 meses sem se desenvolver (HOPE, 1999). Os *C. elegans* podem ser congelados em nitrogênio líquido e recuperados parcialmente (35-45% sobrevivem) (BRENNER, 1974), o que facilita o armazenamento de cepas no laboratório ao longo do tempo como parâmetro de controle. A transparência e a manutenção da posição das células entre diferentes indivíduos ao longo de todo desenvolvimento permitem que se avalie microscopicamente o verme *in vivo* sem necessidade de dissecação (RIDDLE et al., 1997). Além disso, a inserção de proteínas fluorescentes (tais como proteínas fluorescentes verdes e vermelhas) facilita a visualização de estruturas (tais como neurônios) no verme vivo, o que é valioso, por exemplo, em estudos de neurodegeneração (CHALFIE et al., 1994). Em adição, esse modelo invertebrado tem possibilitado o refinamento de pesquisas em vertebrados (KALETTA & HENGARTNER, 2006).

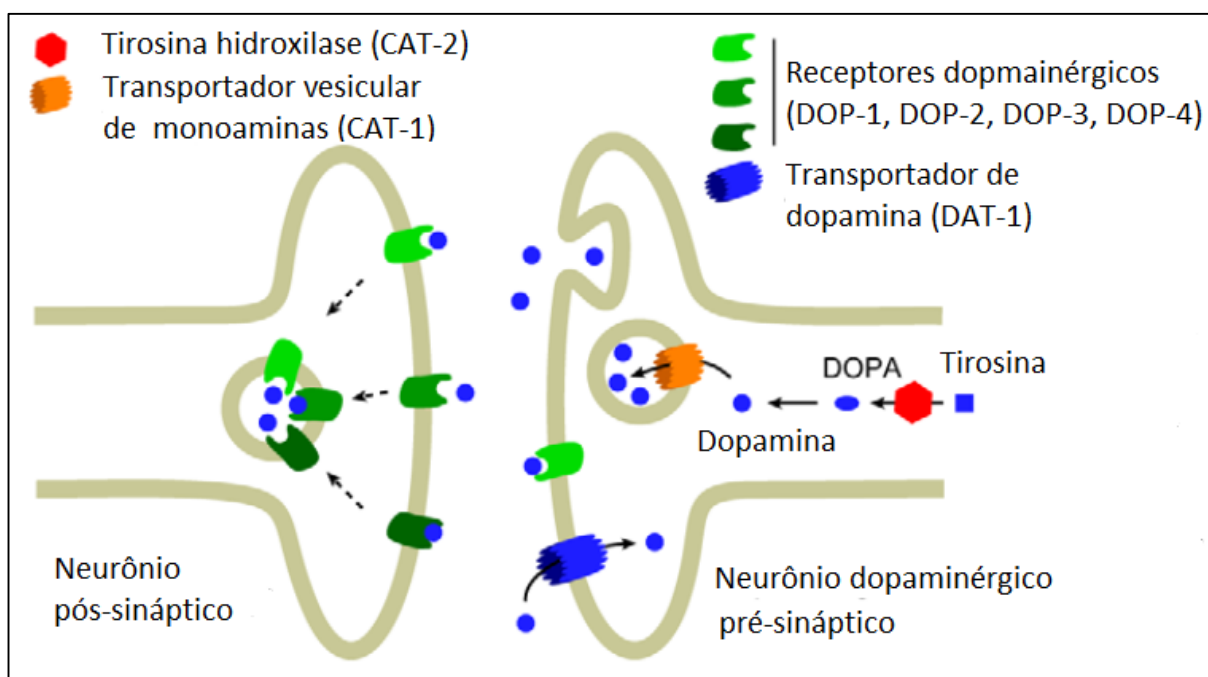
O *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado - sua sequência genômica completa foi publicada no final dos anos 90 (THE C ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998) impulsionando ainda mais os estudos com esse nematóide. O genoma nuclear do *C. elegans* contém cerca de  $10 \times 10^7$  pares de bases, organizados dentro de 6 cromossomos (COULSON et al., 1991), o que equivale a cerca de 20 vezes o tamanho do genoma de *Escherichia coli* e 1/30 do tamanho do de humanos. Além disso, o *C. elegans* apresenta genes correspondentes para 60-80% dos genes humanos (TITUS & MICHAEL, 2006) e diversos homólogos de genes que causam doenças em humanos, o que permite estudos fisiopatológicos e de investigação de tratamentos/mecanismo de ação de drogas. Como exemplo, a DL50 de diversos compostos em *C. elegans* tem mostrado correlação com a de mamíferos (BRAUNGART et al., 2004; ISHIGURO et al., 2001; VED et al., 2005). Além disso, o *C. elegans* mostra alta conservação das vias envolvidas no estresse oxidativo em

mamíferos [estrutura, metabolismo e mecanismo bioenergético da mitocôndria (MURFITT et al., 1976), regulação e expressão de enzimas antioxidantes e detoxificantes (WALKER et al., 2000)], o que contribui para investigação dos mecanismos pelos quais o estresse oxidativo induz toxicidade em humanos. Em adição, a biossíntese, o transporte e o metabolismo de neurotransmissores em *C. elegans* são muito semelhantes aos de humanos (BARGMANN, 1998). Além das vantagens citadas, ainda: 1) bibliotecas de RNA de interferência são capazes de silenciar 90% dos genes em *C. elegans*, fornecendo uma variedade de opções para manipular e estudar processos moleculares no verme; 2) um grande grupo de mutantes está disponível englobando a maior parte dos genes do verme, o que permite análise detalhada de processos celulares. Dentre as diversas espécies, a linhagem referência é N2 (ou selvagem, wild-type em inglês), isolada em Bristol no Reino Unido na década de cinquenta e congelada por John Sulston em 1969 (BRENNER, 1974).

Diversas doenças neurológicas de humanos apresentam bons modelos de estudo em *C. elegans*, como é o caso da doença de Alzheimer (BRANDT et al., 2009; MIYASAKA et al., 2005), da DP (CAO et al., 2005; HAMAMICHI et al., 2008) e da doença de Huntington (CALDWELL et al., 2003; PARKER et al., 2001). A grande vantagem oferecida pelo *C. elegans* nesse tipo de estudo é o fato desse organismo possuir um simples, completo e bem descrito sistema nervoso. Cada verme contém 302 neurônios (humanos possuem cerca de 10 bilhões), 6393 sinapses químicas, 890 junções elétricas do tipo gap, 1410 junções neuromusculares (CHEN et al., 2006). Os neurônios do *C. elegans* concentram-se principalmente no anel nervoso que circula a faringe, na cadeia ou nervo corda ventral e na cauda. Os principais neurotransmissores de humanos, como DA, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, e acetilcolina estão presentes em *C. elegans*, assim como numerosos peptídeos (BARGMANN, 1998), tiramina e octopamina (apresenta funções semelhantes à norepinefrina em humanos) (ALKEMA et al., 2005; HORVITZ et al., 1982; SANYAL et al., 2004; SULSTON et al., 1975). Outras aminas biogênicas como epinefrina, norepinefrina, e histamina ainda não foram identificadas em *C. elegans*.

Conforme descrito na literatura, diversas são as doenças que apresentam como sintoma movimentos involuntários e que estão relacionadas a alterações no sistema dopaminérgico (RANG et al., 2012). O *C. elegans* possui um sistema dopaminérgico bem descrito. Os vermes hermafroditas possuem oito neurônios dopaminérgicos, os quais estão distribuídos em dois pares na região cefálica (CEP), um par antes do bulbo posterior (ADE) e um par posteriormente (PDE) (TOTH et al., 2012; WORM ATLAS, 2009; WORM BASE, 2013). Já os machos

possuem 4 neurônios dopaminérgicos adicionais, os quais estão localizados na cauda e são responsáveis pelo comportamento de cópula (SULSTON et al., 1975). Todos os neurônios são ciliados com dendritos mecanosensórios, e os neurônios dopaminérgicos CEPs em especial têm mostrado responder diretamente a estímulos mecânicos (KANG et al., 2010; KINDT et al., 2007).



**Figura 4.** Representação genérica de uma sinapse dopaminérgica de *C. elegans* mostrando a presença da tirosina hidroxilase (CAT-2), TVMs (CAT-1), receptores dopaminérgicos (DOP-1, DOP-2, DOP-3 e DOP-4) e DAT (DAT-1) (Adaptado de Benedetto et al., 2010)

As funções da DA endógena em *C. elegans* foram evidenciadas através da destruição de neurônios dopaminérgicos com auxílio de laser, também por manipulações genéticas de genes relacionados à DA e pela exposição de vermes a DA exógena (nesse último caso, altas concentrações de DA são necessárias para atravessar a cutícula do verme) (SAWIN et al., 2000). Esses estudos demonstram sinalizações dopaminérgicas na postura de ovos, atividade motora basal, resposta à comida, habituação ao toque e defecação (McDONALD et al., 2006). Além da cópula, uma das principais funções da DA em *C. elegans* é controlar a locomoção (SAWIN et al., 2000). Normalmente a DA causa redução da velocidade de locomoção quando os vermes encontram comida (SAWIN et al., 2000) e a aumenta quando os vermes deixam a fonte com comida (HILLS et al., 2004). Alterações na locomoção do verme nessas condições podem indicar alterações no sistema dopaminérgico (SAWIN, 1996). A DA também tem

importante papel na memória (SAWIN et al., 2000) e na adaptação olfativa do *C. elegans* (COLBERT & BARGMANN, 1995), mas essas avaliações são menos comuns.

Todos os genes que codificam proteínas responsáveis pela biossíntese, estocagem e recaptação de DA estão presentes em *C. elegans* (JAYANTHI et al., 1998; SULSTON et al., 1975). Assim, como em outros animais, os neurônios dopaminérgicos de *C. elegans* expressam genes para tirosina hidroxilase (*cat-2*), dopa descarboxilase (*bas-1*), TVMs (*cat-1*), DAT (*dat-1*), assim como para autoreceptores (*dop-2*). Os mutantes deficientes em *cat-1* não apresentam o padrão de acúmulo de DA normalmente observado nos terminais dopaminérgicos, fenótipo similar ao observado nos vermes selvagens tratados com reserpina (SULSTON et al., 1975). O gene *dat-1* de *C. elegans* apresenta aproximadamente 40% de homologia com o gene DAT humano (JAYANTHI et al., 1998). Os DATs de *C. elegans* localizam-se mais em regiões perinucleares do corpo celular do que nos dendritos; concentrações significativas também são encontradas na região sináptica (McDONALD et al., 2007). Uma grande expressão de DAT é observada nos 4 neurônios dopaminérgicos CEP, seguido pelos ADE e PDE respectivamente (McDONALD et al., 2007). Genes de receptores D1-like também estão presentes em *C. elegans* (*dop-1* e *dop-4*) e estão expressos tanto em locais neuronais como não neuronais (por exemplo, músculo, glia) (SUO et al., 2003). Também, genes para receptores D2-like (*dop-2* e *dop-3*) estão presentes em *C. elegans* (CHASE et al., 2004; RINGSTAD et al., 2009; SUGIURA et al., 2005; SUO et al., 2002, 2003; TSALIK et al., 2003), e esses são restritos aos neurônios onde exercem ações neuroreguladoras, mas o *dop-3* também é expresso em músculos (SUO et al., 2003). Neurônios dopaminérgicos em *C. elegans* também expressam autoreceptores DOP-2, os quais exercem *feedback* negativo (SUO et al., 2003).

Além disso, ao se utilizar a proteína verde fluorescente (GFP – green fluorescent protein) (CAO et al., 2005; NASS et al., 2002) ou a proteína mCherry (HARRINGTON et al., 2012) acoplado a específicos genes para visualizar os neurônios dopaminérgicos em *C. elegans*, é possível o monitoramento de processos neurodegenerativos nos animais vivos, assim como analisar o padrão de expressão, a localização de proteínas, anatomia, processos celulares e fisiológicos (CHALFIE et al., 1994). Vários são os compostos capazes de causar neurodegeneração dopaminérgica em *C. elegans*, como exemplo temos proteínas aberrantes [alfa-sinucleína (CAO et al., 2005; HARRINGTON et al., 2012)], metais pesados [por exemplo, o manganês (BENEDETTO et al., 2010), o metilmercúrio (VANDUYN et al., 2010), o alumínio (VANDUYN et al., 2013)], a 6-OHDA (CAO et al., 2005; RUAN et al., 2010) e fungicidas (HARRISON et al., 2013), pesticidas (NEGGA et al., 2012), inseticidas (MOCKO

et al., 2010) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPP+) (MOCKO et al., 2010; PU & WEIDONG, 2008)]. Quando mutantes com GFP acoplado ao gene *dat-1* (BY200, cepa *dat-1::GFP(vtIs1)* V) são observados ao microscópio, é possível se avaliar a morfologia dos neurônios dopaminérgicos. Diversos trabalhos utilizaram esses mutantes para avaliar neurodegeneração induzida por 6-OHDA, MPTP e manganês (BENEDETTO et al., 2010; NASS et al., 2002; NASS & BLAKELY, 2003; SETTIVARI et al., 2009).

#### 1.6.1 Reserpina e *Caenorhabditis elegans*

Poucos são os trabalhos na literatura que avaliaram a ação da reserpina em *C. elegans*. Sulston et al. (1975) foi quem primeiro mostrou uma ação da reserpina no nematódio *C. elegans*, mas com o intuito de estudar o sistema dopaminérgico desses animais. Eles mostraram que a reserpina diminui a fluorescência induzida por formaldeído em 8 neurônios dopaminérgicos (12 em machos) de *C. elegans*, o que poderia estar relacionado a uma redução dos níveis de DA nos mesmos. Posteriormente, Duerr et al. (1999) realizaram um interessante estudo sobre os TVMs, local de ação da reserpina, em vermes mutantes nocautes *cat-1*. Observaram que o TVMs de *C. elegans* não são nem igual à isoforma 1 de mamíferos, nem à isoforma 2, mas que estão expressos em todas as células que apresentam aminas. Além disso, os mutantes *cat-1* não reduziram a locomoção quando na presença de comida, assim como nos selvagens, resultado igual ao obtido após o tratamento de *C. elegans* selvagens com reserpina.

Os trabalhos que se seguem com reserpina e *C. elegans* basicamente mostram e exploram a capacidade da reserpina de aumentar a longevidade de *C. elegans* (ARYA et al., 2009; SAHARIA et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2008; TAUFFENBERGER et al., 2013). Srivastava et al. (2008) mostrou que a reserpina aumenta a longevidade de *C. elegans* a 25°C, prolonga o tempo de locomoção e de movimentos faríngeos normais, causa atraso no desenvolvimento e reduz a fertilidade (esses dois últimos fatos foram atribuídos ao aumento da longevidade). Esse trabalho também sugere que a serotonina poderia estar envolvida nesse aumento da longevidade (o que posteriormente Sahararia et al. (2012) observou resultados contrários), mas não a cascata *daf-16* da insulina. Como conclusão, Srivastava et al. (2008) sugerem que como muitos agentes que aumentam a longevidade mostram ação protetora frente a doenças neurodegenerativas, logo, a reserpina deveria ser estudada como terapia para doenças neurodegenerativas. Conseqüentemente, Arya et al. (2009) e Saharia et al. (2012) mostraram ação protetora da reserpina (em parâmetros comportamentais, mas não bioquímicos) frente

toxicidade induzida por modelo de doença de Alzheimer e de proteotoxicidade A $\beta$  dependente da idade em *C. elegans*, respectivamente. Em uma tentativa de estudar melhor a relação entre o aumento da longevidade e a ação neuroprotetora, Tauffenberger et al. (2013) avaliaram a ação da reserpina e de outros agentes em um modelo de esclerose lateral amiotrófica em *C. elegans*. Como parte dos resultados, Tauffenberger et al. (2013) mostraram que a reserpina melhora parâmetros comportamentais no modelo utilizado (por exemplo, atrasou o início do desenvolvimento de paralisia), mas não melhora o percentual de neurônios motores GABAérgicos degenerados. Logo, esse último trabalho sugere que nem todos compostos que aumentam a longevidade são neuroprotetores (por exemplo, a reserpina).

Conforme exposto: 1) alterações no sistema dopaminérgico estão presentes em diversas doenças que apresentam movimentos involuntários como sintomatologia; 2) modelos animais como o da reserpina auxiliam no entendimento da fisiopatologia dos movimentos involuntários e na busca por tratamentos efetivos; 3) os efeitos da reserpina no sistema dopaminérgico ainda não estão completamente entendidos; 4) modelos animais alternativos de invertebrados, como *C. elegans*, estão cada vez mais sendo utilizados em substituição e como complementares ao uso de vertebrados em pesquisa; 5) *C. elegans* apresenta sistema dopaminérgico bem descrito; 6) o AG apresenta potencial antioxidante e neuroprotetor. Logo, o presente trabalho utilizou ratos e *C. elegans*, explorando as vantagens de cada modelo animal, de forma a elucidar os mecanismos pelos quais a reserpina induz discinesia orofacial em roedores. Também buscou-se compreender mais sobre a fisiopatologia dos movimentos involuntários e buscar formas de tratamento com o AG. Acredita-se que a reserpina cause depleção de dopamina devido ao bloqueio do TVMs, e neurotoxicidade devido a um acúmulo de DA no espaço sináptico resultante de um efeito da reserpina no DAT. Esses efeitos resultam no desenvolvimento de discinesia orofacial, a qual pode ser revertida pelo tratamento com AG.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos em efeitos comportamentais induzidos por reserpina em ratos e *C. elegans*, com ênfase em parâmetros oxidativos e dopaminérgicos, e o efeito do AG nessas alterações comportamentais em ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Em ratos tratados com reserpina e/ou AG avaliar:
  - a frequência de MMVs;
  - os danos oxidativos e a concentração de antioxidantes em estriado e córtex cerebral;
  - a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em estriado e córtex cerebral;
  - o efeito desses compostos sobre o DAT e a TH em estriado cerebral;
  - parâmetro antiapoptótico (Bcl-2) em estriado cerebral.
- Em ensaio *in vitro*:
  - avaliar o efeito do AG na atividade da MAO em cérebro total de ratos não tratados.
- Em *C. elegans* expostos a reserpina, investigar:
  - a sobrevivência e o estado geral dos vermes (desenvolvimento, estado alimentar e reprodutivo, defecação);
  - as alterações no sistema dopaminérgico, através de avaliações comportamentais, níveis de DA, morfologia de neurônios dopaminérgicos;
  - os locais de ação da reserpina no sistema dopaminérgico;
  - alterações na síntese de defesas antioxidantes.



### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Artigo 1**

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 104 (2013) 132–137

#### **Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats**

Patrícia Reckziegel <sup>a</sup>, Luis Ricardo Peroza <sup>b</sup>, Larissa Finger Schaffer <sup>a</sup>, Mayara Calegari Ferrari <sup>c</sup>, Catiúscia Molz de Freitas <sup>b</sup>, Marilise Escobar Bürger <sup>a,b</sup>, Roselei Fachinetto <sup>a,b</sup>

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

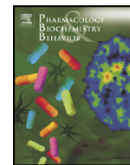
<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

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



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh](http://www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh)

## Gallic acid decreases vacuuous chewing movements induced by reserpine in rats

Patrícia Reckziegel <sup>a</sup>, Luis Ricardo Peroza <sup>b</sup>, Larissa Finger Schaffer <sup>a</sup>, Mayara Calegari Ferrari <sup>c</sup>,  
Catiúscia Molz de Freitas <sup>b</sup>, Marilise Escobar Bürger <sup>a,b</sup>, Roselei Fachinnetto <sup>a,b,\*</sup>

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

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

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

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 August 2012

Received in revised form 26 December 2012

Accepted 3 January 2013

Available online 11 January 2013

## Keywords:

Dopaminergic neurotoxicity

Involuntary movements

Na<sup>+</sup> pump

Oxidative stress

Movement disorders

Parkinsonism

## ABSTRACT

Involuntary oral movements are present in several diseases and pharmacological conditions; however, their etiology and efficient treatments remain unclear. Gallic acid is a natural polyphenolic acid found in gall nuts, sumac, oak bark, tea leaves, grapes and wine, with potent antioxidant and antiapoptotic activity. Thus, the present study investigated the effects of gallic acid on vacuuous chewing movements (VCMs) in an animal model induced by reserpine. Rats received either vehicle or reserpine (1 mg/kg/day, s.c.) during three days, followed by treatment with water or different doses of gallic acid (4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o.) for three more days. As result, reserpine increased the number of VCMs in rats, and this effect was maintained for at least three days after its withdrawal. Gallic acid at two different doses (13.5 and 40.5 mg/kg/day) has reduced VCMs in rats previously treated with reserpine. Furthermore, we investigated oxidative stress parameters (DCFH-DA oxidation, TBARS and thiol levels) and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in striatum and cerebral cortex, however, no changes were observed. These findings show that gallic acid may have promissory use in the treatment of involuntary oral movements.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Involuntary oral movements are important symptoms associated with several diseases or pharmacological conditions, such as Parkinson's disease or tardive dyskinesia, respectively (Andreassen and Jørgensen, 2000; Dauer and Przedborski, 2003; Lotharius and Brundin, 2002; Thomas and Beal, 2007). These movements are highly prevalent in the population around the world. It is worth mentioning that Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease, affecting approximately 1–2% of the population over 65 years (Alves et al., 2008), while tardive dyskinesia has a prevalence of 24.2% in patients under chronic antipsychotic treatment (this number can change according to age, gender, antipsychotic class, etc.) (Yassa and Jeste, 1992). Up to now, the pathophysiology of the involuntary oral movements, as well as the efficient treatments, remain unclear (Andreassen et al., 2003; Lohr et al., 2003).

Several drugs, such as reserpine, a monoamine-depleting agent, have been used experimentally as an auxiliary in the study of involuntary oral movements. Literature data show that repeated administrations of reserpine increase the number of vacuuous chewing movements (VCMs) in animal models (Abílio et al., 2004; Barcelos

et al., 2011; Burger et al., 2003; Busanello et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Neisewander et al., 1994; Pereira et al., 2011; Teixeira et al., 2008, 2009). It is suggested that oxidative stress, at least in part, is involved in VCMs pathophysiology (Abílio et al., 2003; Bilska and Dubiel, 2007; Burger et al., 2003; Fachinnetto et al., 2005; Faria et al., 2005; Fernandes et al., 2012; Naidu et al., 2004; Teixeira et al., 2008, 2009). Accordingly, some studies have showed that reserpine administration decreases the levels of some antioxidant defenses and increases oxidative markers in animals (Abílio et al., 2003; Teixeira et al., 2008). Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is an enzyme sensitive to oxidative stress status (Morel et al., 1998). However, the role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity has not been completely established in animal models of involuntary oral movements induced by reserpine in rats.

Recent studies have demonstrated that several natural antioxidants can minimize involuntary movements in reserpine-treated animals (Barcelos et al., 2011; Busanello et al., 2011; Castro et al., 2006; Faria et al., 2005; Pereira et al., 2011; Trevizol et al., 2011) and "in" other involuntary oral movement models (Barcelos et al., 2010; Bishnoi et al., 2008; Busanello et al., 2012; Naidu et al., 2003; Sachdev et al., 1999; Trevizol et al., 2011). Gallic acid (3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid) is an important polyphenolic compound found in plants and foods (Eslami et al., 2010) especially in gallnuts, sumac, oak bark, green tea, grapes, strawberries, pineapples, bananas, lemons, witch hazel, red and white wines and apple peels (Chu et al., 2002; Wolfe et al., 2003). It has received attention because of its potent ability to scavenge ROS (Kim, 2007; Priscilla and Prince, 2009),

\* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 21, Sala 5213, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 21 55 3220 8096; fax: +55 21 55 3220 8241.

E-mail address: [roseleirf@gmail.com](mailto:roseleirf@gmail.com) (R. Fachinnetto).

antiapoptotic (Pal et al., 2010; Sameermahmood et al., 2010) and antitumoral activity (Inoue et al., 1994; Kawada et al., 2001; Serrano et al., 1998). Of particular importance to our present investigation, it was recently demonstrated that gallic acid treatment attenuated locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead in rats (Reckziegel et al., 2011). Currently, there are no studies investigating the action of gallic acid in involuntary movements induced by reserpine. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of gallic acid on VCMs, oxidative stress parameters, and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in rat cerebral cortex and striatum after reserpine treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult male Wistar rats (220–270 g) were kept in a room with controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 am). Food and water were provided *ad libitum*. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Nacional 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 010/2012.

### 2.2. Drugs

All reagents were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Reserpine (methyl reserpate 3, 4, 5-trimethoxybenzoic acid ester) was dissolved in saline solution containing 0.2% acetic acid and its vehicle consisted of the same preparation without reserpine. Gallic acid (3, 4, 5-trihydroxybenzoic acid) was dissolved in Milli-Q water, protected from light and used within 10 min from preparation. All solutions were administered to the animals in a constant volume of 1 ml/kg body weight.

### 2.3. Experimental design

Rats were treated with either 1 mg/kg reserpine ( $n = 37$ ) or its vehicle ( $n = 31$ ) subcutaneously once a day (8:00 am) for 3 consecutive days. After this treatment (day 4), rats from each group were subdivided into 4 groups and treated by gavage with either water or different doses of gallic acid (4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, divided

in two daily administrations at 8:00 a.m. and 5:00 p.m.) for 3 consecutive days (Fig. 1). The experimental groups were as follows: control (C,  $n = 10$ ), 4.5 mg/kg gallic acid (GA, 4.5 mg/kg/day,  $n = 5$ ), 13.5 mg/kg gallic acid (GA, 13.5 mg/kg/day,  $n = 11$ ), 40.5 mg/kg gallic acid (GA, 40.5 mg/kg/day,  $n = 5$ ), reserpine (R, 1 mg/kg/day  $n = 12$ ), reserpine plus 4.5 mg/kg gallic acid (R+GA, 4.5 mg/kg/day,  $n = 6$ ), reserpine plus 13.5 mg/kg gallic acid (R+GA, 13.5 mg/kg/day,  $n = 13$ ), and reserpine plus 40.5 mg/kg gallic acid (R+GA, 40 mg/kg/day  $n = 6$ ).

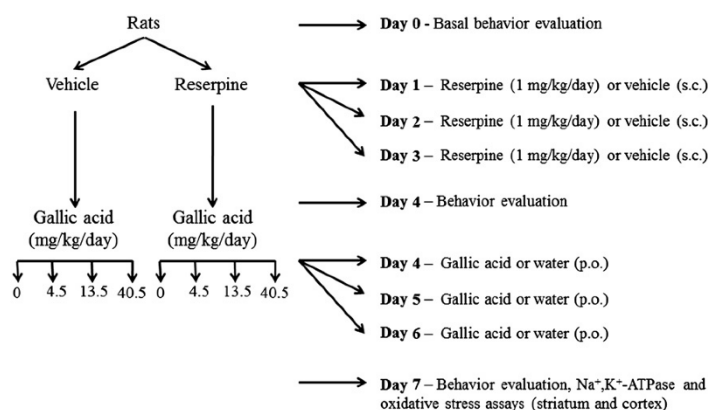
### 2.4. Behavioral test – quantification of VCMs

The number of VCMs was evaluated before each treatment (day 0) (animals that spontaneously presented more than 20 VCMs during a 6 minute observation period were not included in the study). Subsequent evaluations were carried out on days 4 (14 h after the last reserpine injection) and 7 (14 h after the last gallic acid administration) (Fig. 1).

To quantify the VCMs, the rats were placed individually in glass cages ( $20 \times 20 \times 19$  cm) containing one movable mirror under the floor to permit the observation of VCMs when the animals were away from the observer. The VCMs were recorded during 6 min after a 6 minute acclimation period, according to the previously published method (Fachinnetto et al., 2005, 2007a,b; Busanello et al., 2012). VCM is defined as a single mouth opening on the vertical plane not directed toward physical material. If VCMs occurred during a period of grooming, they were not taken into account. After each test, the cages were cleaned with 30% alcohol solution to eliminate possible odors and prevent the next animal from smelling the previous one. Experimenters were always blind to treatments.

### 2.5. Tissue preparation and biochemical assays

After the last behavioral test, on day 7, the animals were killed by decapitation and the brains were rapidly dissected and placed into a Petri dish on ice. Cortical and striatal tissues were dissected and homogenized in 10 volumes (w/v) of 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, and then centrifuged (3000 rpm/10 min). The resulting supernatants were used in biochemical assays described below. Brain regions were chosen according to the neuropathology associated with VCM development that has been described in striatum especially in ventrolateral striatum (Kelley et al., 1989; Salamone et al., 1998). On



**Fig. 1.** Experimental design. Rats were treated with saline or reserpine (1 mg/kg/day, s.c.) during 3 days. After treatment (day 4), rats from each group were divided in 4 subgroups and treated by gavage with water or different doses of gallic acid (4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o.). The experimental groups were as follows: control (C,  $n = 10$ ), 4.5 mg/kg gallic acid ( $n = 5$ ), 13.5 mg/kg gallic acid ( $n = 11$ ), 40.5 mg/kg gallic acid ( $n = 5$ ), reserpine ( $n = 12$ ), reserpine plus 4.5 mg/kg gallic acid ( $n = 6$ ), reserpine plus 13.5 mg/kg gallic acid ( $n = 13$ ) and reserpine plus 40.5 mg/kg gallic acid ( $n = 6$ ). Striatum and cortex were used for biochemical assays of DCFH-DA oxidation, TBARS, thiols and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Behavior evaluations were performed on days 0, 4 and 7.

the other hand, the cortical regions of the brain were not involved in the control of involuntary movements, therefore, it was considered as a negative control.

#### 2.5.1. 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation

DCFH-DA assay was used to estimate ROS levels in samples. In the present study, supernatants of striatum and cortex were incubated with DCFH-DA, according to Pérez-Severiano et al. (2004). Fluorescence of the samples was determined at 488 nm for excitation and 520 nm for emission. The difference between the fluorescence at 30 and 15 min of reaction was defined as the result and expressed as DCFH-DA oxidation.

#### 2.5.2. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS were measured according to the method of Ohkawa et al. (1979), with some modifications. Supernatants of striatum and cortex were incubated with sodium dodecyl sulfate (8.1%), acetic acid (20%) and thiobarbituric acid (TBA, 0.6%). The mixture was heated at 95 °C for 60 min using a glass ball as condenser. A standard curve was prepared using increased concentrations of malondialdehyde (MDA, the main product of lipid peroxidation) incubated in parallel. The reaction product was determined at 532 nm. Results were expressed as nmol MDA/g tissue.

#### 2.5.3. Thiols

Thiol content was determined in the present study according to Ellman (1959). For non-proteic thiol content, trichloroacetic acid (TCA) was added to the supernatants of striatum and cortex, centrifuged and the supernatants were then used. Ellman's reagent [5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB] was added to the samples and the formed chromogen was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results of proteic and non-proteic thiols were expressed as  $\mu\text{mol}$  proteic thiol/g tissue and  $\mu\text{mol}$  non-proteic thiol/g tissue, respectively.

#### 2.5.4. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity

A classical pharmacological approach described by Nishi et al. (1999) and Oliveira et al. (2009), based on the isoform-specific sensitivity to ouabain, was used to evaluate whether some  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  isoforms are selectively inhibited (or not) by reserpine and/or gallic acid. Briefly, the assay medium consisted of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 80 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM EDTA and 10  $\mu\text{g}$  protein in the presence or absence of 3  $\mu\text{M}$  (that inhibits  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase isoforms containing  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms). The reaction was started by addition of 3 mM adenosine triphosphate. After 20 min, the reaction was stopped by addition of trichloroacetic acid. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as reference standard. The reaction product was determined at 630 nm. Total and  $\alpha 1$  isoform  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activities were calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed as nmol Pi/min/mg protein. Protein content of the sample was measured according to methodology of Lowry (1951).

#### 2.6. Statistical analysis

Data from VCMs on day 4 were analyzed using unpaired t test. Additional data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Significance was considered when  $p < 0.05$ . All data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### 3. Results

#### 3.1. Effects of reserpine and/or gallic acid on VCMs in rats

Reserpine treatment caused a marked increase on VCMs number in rats compared with control group after 3 consecutive days of its administration (day 4, Fig. 2A,  $p < 0.0001$ ). Afterwards, control and reserpine treated animals were subdivided into four another groups and treated with water or different doses of gallic acid (4.5, 13.5, 40.5 mg/kg/day) to evaluate a dose–response curve. Behavioral evaluation on day 7 (Fig. 1B) showed that the VCMs number remained increased 3 days after the last administration of reserpine in relation to control group ( $F(7.68) = 10.77$ ,  $p < 0.0001$ ). In addition, *post-hoc* analyses demonstrated that gallic acid treatment was effective in decreasing VCMs when compared to reserpine group at doses of 13.5 mg/Kg/day and 40.5 mg/Kg/day ( $p < 0.01$ ). However, no statistical differences were observed between the doses of 13.5 and 40.5 mg/kg. The lowest dose tested (4.5 mg/kg/day) has partially reversed the effect of reserpine on VCMs. In addition, gallic acid did not cause effects *per se* on VCMs at the tested doses.

#### 3.2. Effects of reserpine and/or gallic acid on oxidative stress parameters and $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in striatum and cortex of rats

Reserpine and/or gallic acid in all doses (4.5, 13.5 and 40.5 mg/kg/day) did not have any effect on DCFH-DA oxidation, TBARS levels, proteic or non-proteic thiol levels (Table 1) and on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (total and  $\alpha 1$  subunit) in striatum or cortex of the animals (Table 2).

### 4. Discussion

The involuntary oral movements are important clinical aspects of several diseases that affect a high percentage of the world's population, such as Parkinson's disease, tardive dyskinesia (Andreassen and Jørgensen, 2000; Dauer and Przedborski, 2003; Lotharius and Brundin,

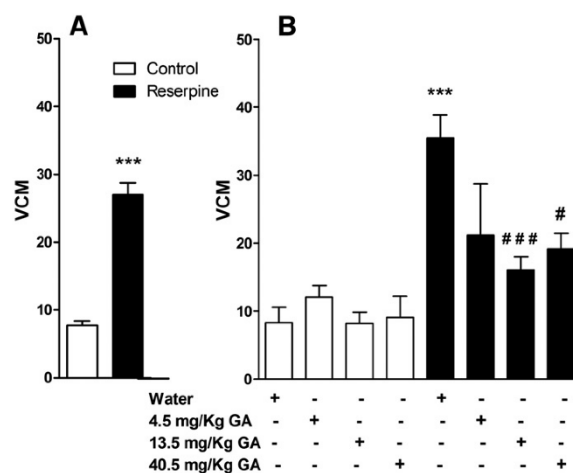


Fig. 2. (A) VCM during 6 min in rats treated with reserpine (1 mg/kg/day, s.c., for three days) or its vehicle (day 4). Data were analyzed by unpaired t test. \*\*\* shows significant differences when compared to control group ( $p < 0.0001$ ). (B) VCM during 6 min in rats treated with different doses of gallic acid (GA, 4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o., for three days) or water, after previous treatment with reserpine (1 mg/kg/day, s.c. for three days) or its vehicle (day 7). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*\*\* shows significant differences compared to control group ( $p < 0.0001$ ); # shows significant differences compared to reserpine group ( $p < 0.01$ ); ### shows differences compared to reserpine group ( $p < 0.0001$ ).



**Table 1**

Oxidative stress and antioxidant parameters in striatum and cortex of rats treated with reserpine (R, 1 mg/kg/day, s.c., during 3 days) or its vehicle followed by treatment with different doses of gallic acid (GA, 4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o.) or water for 3 consecutive days.

		Control	GA 4.5 mg/kg	GA 13.5 mg/kg	GA 40.5 mg/kg	R	R + GA 4.5 mg/kg	R + GA 13.5 mg/kg	R + GA 40.5 mg/kg
DCFH-DA	Striatum	77.04 ± 7.094	78.31 ± 5.68	69.94 ± 5.00	89.47 ± 6.50	89.52 ± 10.58	76.68 ± 8.07	65.35 ± 3.14	90.58 ± 12.29
	Cortex	82.79 ± 5.58	73.37 ± 8.34	78.41 ± 5.00	81.90 ± 5.78	78.04 ± 4.19	82.73 ± 4.28	75.43 ± 3.86	92.26 ± 4.92
TBARS	Striatum	15.70 ± 0.84	16.21 ± 0.40	11.36 ± 1.35	16.61 ± 1.27	13.78 ± 0.89	14.48 ± 0.65	11.30 ± 1.10	16.13 ± 1.30
	Cortex	11.54 ± 0.65	12.83 ± 0.64	13.38 ± 0.75	11.45 ± 0.5	11.73 ± 0.67	11.12 ± 0.38	13.00 ± 0.82	12.80 ± 0.58
Proteic thiol	Striatum	58.91 ± 2.34	58.42 ± 1.72	59.25 ± 2.48	55.81 ± 2.55	59.47 ± 1.37	59.74 ± 1.14	59.17 ± 1.68	60.29 ± 1.21
	Cortex	62.90 ± 1.35	62.25 ± 1.76	63.13 ± 1.46	61.10 ± 2.09	63.38 ± 1.33	64.17 ± 2.06	65.89 ± 1.87	65.59 ± 2.11
Non-proteic THIOI	Striatum	7.46 ± 0.35	7.78 ± 0.25	7.55 ± 0.27	7.64 ± 0.28	7.98 ± 0.31	7.47 ± 0.23	7.24 ± 0.44	7.98 ± 0.22
	Cortex	7.97 ± 0.45	7.19 ± 0.43	7.75 ± 0.43	8.29 ± 0.22	7.60 ± 0.34	7.85 ± 0.35	8.19 ± 0.41	8.06 ± 0.16

Data (mean ± S.E.M.) were analyzed using one-way ANOVA. DCFH-DA: DCFH-DA oxidation; TBARS: nmol MDA/g tissue; proteic thiol:  $\mu\text{mol}$  proteic thiol/g tissue; non-proteic thiol:  $\mu\text{mol}$  non-proteic thiol/g tissue.

2002; Thomas and Beal, 2007), Huntington's disease (Brouillet et al., 1999) or Alzheimer's disease (Donaire and Gil-Saladié, 2001). The chronic course and irreversibility of the aforementioned diseases make the involuntary movements an important clinical symptom to be studied. Currently, there are no efficient treatments for these movements. However, natural antioxidants are showing protective effects in experimental models (Barcelos et al., 2011; Busanello et al., 2011; Castro et al., 2006; Faria et al., 2005; Pereira et al., 2011; Trevizol et al., 2011), suggesting that additional studies are necessary. In the present investigation, gallic acid was tested against involuntary oral movements induced by reserpine in rats. The results revealed that reserpine increased VCMs and gallic acid was able to reverse them in all tested doses (4.5, 13.5 and 40.5 mg/kg/day) without direct relation with oxidative stress and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in striatum and cerebral cortex.

Reserpine has been used experimentally as a tool to understand the involuntary oral movements. In this study, it was observed that this monoamine depleting agent increased VCMs in animals after three days of treatment with 1 mg/kg/day, and this increase was maintained at least three days after reserpine withdrawal. Similarly, others studies have observed an increase in VCMs with reserpine administration (Abílio et al., 2004; Barcelos et al., 2011; Burger et al., 2003; Busanello et al., 2011; Dutra et al., 2002; Faria et al., 2005; Fernandes et al., 2012; Neisewander et al., 1994; Pereira et al., 2011; Silva et al., 2002; Teixeira et al., 2008, 2009; Trevizol et al., 2011) as well as the maintenance of VCMs after the last administration of reserpine (Neisewander et al., 1994), suggesting that the depletion of monoamines by reserpine causes damage that is not reversed by only recovering the vesicular monoamine transporter activity. Here, the treatment with gallic acid was able to decrease VCMs induced by reserpine in rats.

Several pharmacological properties have been attributed to gallic acid: antioxidant (Kim, 2007; Priscilla and Prince, 2009), antimutagenic, anticarcinogenic (Hansi and Stanely, 2009; Kim, 2007) and antitumoral (Inoue et al., 1994; Kawada et al., 2001; Serrano et al., 1998). In addition, Pal et al. (2010) showed that gallic acid can prevent apoptosis induced by indometacin in rats by avoiding activation of caspase 3 and 9. In the present study, we tested three different doses of gallic acid (4.5, 13.5

and 40.5 mg/kg/day). Two higher doses were able to decrease VCMs induced by reserpine in rats. However, gallic acid at a dose of 4.5 mg/kg/day has partially decreased VCMs induced by reserpine. The results showed the potential of this polyphenol to reverse involuntary oral movements. Hence, a previous study showed that gallic acid at a dose of 13.5 mg/kg/day has reversed motor damages and brain oxidative alterations induced by lead in rats (Reckziegel et al., 2011). In some other studies, gallic acid also showed neuroprotective effects against  $\beta$ -amyloid peptide in neural cells (Bastianetto et al., 2006), 6-hydroxydopamine in rats (Mansouri et al., 2005) and streptozotocin (Prince et al., 2011). It is important to emphasize that LD50 for gallic acid is 5 g/kg to rats (Shahrzad et al., 2001). Therefore, in addition to its promissory use against involuntary movements described in the present study, gallic acid has low toxicity and can be found in foods of easy access by the general population, and at low cost (Chu et al., 2002; Wolfe et al., 2003).

Similarly to gallic acid, other antioxidants showed protective effects against VCMs induced by reserpine (Barcelos et al., 2011; Busanello et al., 2011; Castro et al., 2006; Faria et al., 2005; Pereira et al., 2011; Trevizol et al., 2011). However, the oxidative stress markers have not been altered in brain areas related to movement control (like striatum) in all studies (Abílio et al., 2003; Bilska and Dubiel, 2007; Burger et al., 2003; Fachinnetto et al., 2007a,b; Faria et al., 2005; Fernandes et al., 2012; Naidu et al., 2004; Pereira et al., 2011; Teixeira et al., 2008, 2009), suggesting the involvement of other mechanisms in VCMs development. In the present study, gallic acid showed beneficial effects against VCMs induced by reserpine and no alterations were observed in DCFH-DA oxidation, TBARS levels, proteic and non-proteic thiol levels neither in striatum nor in cortex of reserpine-treated animals, as well as in the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, an enzyme with redox control (Morel et al., 1998). As result, it is possible to conclude that some other events may be related to involuntary movement development and maintenance besides oxidative stress. Recently, Goldstein et al. (2012) demonstrated that inhibition of vesicular monoamine transporter-2 induced by reserpine led to decreased vesicular sequestration of cytosolic catecholamines and impaired catecholaldehyde detoxification. These events could contribute to the catecholaminergic denervation that characterizes

**Table 2**

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity (total and  $\alpha 1$  subunit) in striatum and cortex of rats treated with reserpine (R, 1 mg/kg/day, s.c., during 3 days) or its vehicle followed by treatment with different doses of gallic acid (GA, 4.5, 13.5 or 40.5 mg/kg/day, p.o.) or water for 3 consecutive days.

	Control	GA 4.5 mg/kg	GA 13.5 mg/kg	GA 40.5 mg/kg	R	R + GA 4.5 mg/kg	R + GA 13.5 mg/kg	R + GA 40.5 mg/kg
Total (4 mM ouabain)								
Striatum	101.67 ± 5.59	105.71 ± 1.73	109.63 ± 2.07	107.35 ± 2.54	105.25 ± 0.92	109.57 ± 2.25	105.53 ± 2.13	104.38 ± 2.30
Cortex	94.95 ± 4.08	93.37 ± 4.03	94.84 ± 2.88	95.78 ± 1.41	94.21 ± 3.09	93.79 ± 2.25	90.28 ± 1.94	93.16 ± 3.87
$\alpha 1$ subunit (3 $\mu\text{M}$ ouabain)								
Striatum	92.77 ± 4.88	93.59 ± 2.24	93.59 ± 2.83	95.11 ± 3.56	93.59 ± 1.17	93.65 ± 2.58	91.94 ± 0.97	91.54 ± 2.39
Cortex	83.87 ± 2.75	80.32 ± 3.42	82.62 ± 1.37	80.58 ± 4.17	83.51 ± 1.77	81.52 ± 4.30	80.67 ± 1.77	81.34 ± 1.77

Data (mean ± S.E.M.) were analyzed using one-way ANOVA. Values are expressed as nmol Pi/min/mg protein.

Parkinson's disease (Goldstein et al., 2012). In this sense, reserpine-induced involuntary movements may be related to apoptotic events in monoaminergic neurons. Furthermore, it has been showed that apoptosis may or may not be associated with alterations in oxidative stress parameters. In this context, gallic acid may show protective effect due to its potent antiapoptotic property.

Collectively, the results from the present study demonstrate that gallic acid was able to decrease VCMs induced by reserpine in rats and may have promissory use in the treatment of involuntary movements.

## 5. Conclusions

Gallic acid protects against the neurotoxic effects of reserpine in an animal model of VCM. Our results suggest that gallic acid is a promising molecule as therapeutic agent for treating involuntary oral movements. However, further studies are necessary to elucidate the mechanisms of gallic acid protection.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Mauro Schneider Oliveira for his important contribution. This work was supported by the PRONEM#11/2029-1 and PRONEX/FAPERGS. M.E.B. received a fellowship from CNPq. P.R., L.R.P. and L.F.S received a fellowship from CAPES. M.C.F. received a fellowship from FIPE-UFSM.

## References

- Abílio VC, Araujo CCS, Bergamo M, Calvente PRV, D'Almeida V, Ribeiro R de A, et al. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:109–14.
- Abílio VC, Silva RH, Carvalho RC, Grassl C, Calzavara MB, Registro S, et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. *Neuropharmacology* 2004;47:263–72.
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 2008;255(Suppl. 5):18–32.
- Andreassen OA, Jørgensen HA. Neurotoxicity associated with neuroleptic induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* 2000;61:525–41.
- Andreassen OA, Ferrante RJ, Aamo TO, Beal MF, Jørgensen HA. Oral dyskinesias and histopathological alterations in substantia nigra after long-term haloperidol treatment of old rats. *Neuroscience* 2003;122:717–25.
- Barcelos RCS, Benvenú DM, Boufleu N, Reckziegel P, Müller LG, Pase CS, et al. Effects of  $\alpha$ -3 essential fatty acids ( $\omega$ -3 EFAs) on motor disorders and memory dysfunction typical neuroleptic-induced: behavioral and biochemical parameter. *Neurotox Res* 2010;17:228–37.
- Barcelos RCS, Benvenú DM, Boufleu N, Pase C, Teixeira AM, Reckziegel P, et al. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. *Lipids* 2011;46:143–9.
- Bastianetto S, Yao ZX, Papadopoulos V, Quirion R. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against  $\beta$ -amyloid induced toxicity. *Eur J Neurosci* 2006;23:55–64.
- Bílka A, Dubiel M. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience* 2007;146:1758–71.
- Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;88:511–22.
- Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 1999;59:427–68.
- Burger ME, Alves A, Callegari L, Athayde FR, Nogueira CW, Zeni G, et al. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:135–40.
- Busanello A, Barbosa NBV, Peroza LR, Farias LE, Burger ME, Barreto KP, et al. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. *Behav Pharmacol* 2011;22:71–5.
- Busanello A, Peroza LR, Wagner C, Sudati JH, Pereira RP, Prestes AS, et al. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;101:307–10.
- Castro JPMV, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, Silva RH, Medrano WA, Ribeiro R de A, et al. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull* 2006;68:436–41.
- Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* 2002;50:6910–6.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909.
- Donaire AM, Gil-Saladié D. Progressive primary aphasia associated with corticobasal degeneration. *Rev Neurol* 2001;32:1051–4.
- Dutra RC, Andreazza AP, Andreatini R, Tufik S, Vital MABF. Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26:487–95.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- Eslami AC, Pasanphan W, Wagner BA, Buettner GR. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: an electron paramagnetic resonance study. *Chem Cent J* 2010;88:4–15.
- Fachinnetto R, Burger MB, Wagner C, Wondracek DC, Brito VB, Nogueira CW, et al. High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:585–92.
- Fachinnetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, et al. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* 2007a;194:423–32.
- Fachinnetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Ávila DS, Burger ME, et al. *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007b;31:1478–86.
- Faria RR, Abílio VC, Grassl C, Chinen CC, Negrão LTR, de Castro JPMV, et al. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. *Neuropharmacology* 2005;48:993–1001.
- Fernandes VS, Santos JR, Leão AHFF, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2012;231:154–63.
- Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375–400.
- Goldstein DS, Sullivan P, Cooney A, Jinsmaa Y, Sullivan R, Gross DJ, et al. Vesicular uptake blockade generates the toxic dopamine metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde in PC12 cells: relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2012;123:932–43.
- Hansi PD, Stanelly PP. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem Biol Interact* 2009;179:118–24.
- Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:898–904.
- Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuugetu H, Asai T, et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 2001;12:847–52.
- Kelley AE, Bakshi VP, Delfs JM, Lang CG. Cholinergic stimulation of the ventrolateral striatum elicits mouth movements in rats: pharmacological and regional specificity. *Psychopharmacology* 1989;99:542–9.
- Kim YJ. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1052–5.
- Lohr JB, Kuczenski R, Niculescu AB. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. *CNS Drugs* 2003;17:47–62.
- Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:932–42.
- Lowry OH. Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- Mansouri MT, Naghizadeh B, Hosseinzadeh H. The effect of *Pistacia vera* L. gum extract on oxidative damage during experimental cerebral ischemia reperfusion in rats. *Iran Biomed J* 2005;9:181–5.
- Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 1998;33:531–40.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK. Reversal of haloperidol-induced orofacial dyskinesia by quercetin, a bioflavonoid. *Psychopharmacology* 2003;167:418–23.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. *Pharmacology* 2004;70:59–67.
- Neisewander JL, Castañeda E, Davis DA. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology* 1994;116:79–84.
- Nishi A, Fisone G, Snyder GL, Dulubova I, Aperia A, Nairn AC, et al. Regulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem* 1999;73:1492–501.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Ribeiro LRF, et al. Prostaglandin E2 modulates  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 2009;109:416–26.
- Pal C, Bindu S, Dey S, Alam A, Goyal M, Iqbal S, et al. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rats by blocking oxidative stress and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;49:258–67.
- Pereira RP, Fachinnetto R, Prestes A de D, Wagner C, Sudati JH, Boligon AA, et al. *Valeriana officinalis* ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *J Neural Transm* 2011;118:1547–57.

- Pérez-Severiano P, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortíz-Plata A, et al. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 2004;45:1175–83.
- Prince SMP, Kumar MR, Selvakumari CJ. Effects of gallic acid on brain lipid peroxide and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2011;25:101–7.
- Priscilla DH, Prince PSM. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem Biol Interact* 2009;179:118–24.
- Reckziegel P, Dias VT, Benvegnú D, Bouffleur N, Barcelos RCS, Segat HJ, et al. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. *Toxicol Lett* 2011;203:74–81.
- Sachdev P, Saharov T, Cathcart S. The preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin E) in a rat model of tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* 1999;46:1672–81.
- Salamone JD, Mayorga AJ, Trevitt JT, Cousins MS, Conlan A, Nawab A. Tremulous jaw movements in rats: a model of Parkinsonian tremor. *Prog Neurobiol* 1998;56:591–611.
- SameerMahmood Z, Raji L, Saravanan T, Vaidya A, Mohan V, Balasubramanyam M. Gallic acid protects RINm5F b-cells from glucolipotoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions. *Phytother Res* 2010;24:583–94.
- Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespón C, Villar ML, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys* 1998;350:49–54.
- Shahzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 2001;131:1207–10.
- Silva RH, Abílio VC, Torres-Leite D, Bergamo M, Chinen CC, Claro FT, et al. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. *Behav Brain Res* 2002;132:171–7.
- Teixeira AM, Trevizol F, Colpo G, Garcia SC, Charão M, Pereira RP, et al. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: behavioral and antioxidant evaluations. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;88:465–72.
- Teixeira AM, Reckziegel P, Müller L, Pereira RP, Roos DH, Rocha JBT, et al. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;92:231–5.
- Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007;16:R183–94.
- Trevizol F, Benvegnú DM, Barcelos RCS, Pase CS, Segat HJ, Dias VT, et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. *Behav Brain Res* 2011;221:13–8.
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 2003;51:609–14.
- Yassa R, Jeste DV. Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. *Schizophr Bull* 1992;18:701–15.

### 3.2 Artigo 2

Archives of Toxicology (2015) DOI 10.1007/s00204-015-1451-7

#### **Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans***

Patrícia Reckziegel <sup>a</sup>, Pan Chen <sup>b</sup>, Sam Caito <sup>b</sup>, Priscila Gubert <sup>c</sup>, Félix Alexandre Antunes Soares <sup>c</sup>, Roselei Fachinetto <sup>a</sup>, Michael Aschner <sup>b</sup>

#### AFFILIATIONS

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>b</sup> Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York, USA;

<sup>c</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.



## Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans*

Patrícia Reckziegel · Pan Chen · Sam Caito ·  
Priscila Gubert · Félix Alexandre Antunes Soares ·  
Roselei Fachinetto · Michael Aschner

Received: 21 September 2014 / Accepted: 6 January 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Reserpine is used as an animal model of parkinsonism. We hypothesized that the involuntary movements induced by reserpine in rodents are induced by dopaminergic toxicity caused by extracellular dopamine accumulation. The present study tested the effects of reserpine on the dopaminergic system in *Caenorhabditis elegans*. Reserpine was toxic to worms (decreased the survival, food intake, development and changed egg laying and defecation cycles). In addition, reserpine increased the worms' locomotor rate on food and decreased dopamine levels. Morphological evaluations of dopaminergic CEP neurons confirmed neurodegeneration characterized by decreased fluorescence intensity and the number of worms with intact CEP neurons, and increased number of shrunken somas per worm. These effects were unrelated to reserpine's effect on decreased expression of the dopamine transporter, *dat-1*. Interestingly, the locomotor rate on food and the neurodegenerative parameters fully recovered to basal conditions upon reserpine withdrawal. Furthermore, reserpine decreased survival in vesicular monoamine transporter and *dat-1* loss-of-function mutant worms. In addition, worms

pre-exposed to dopamine followed by exposure to reserpine had decreased survival. Reserpine activated *gst-4*, which controls a phase II detoxification enzymes downstream of nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2. Our findings establish that the dopamine transporter, *dat-1*, plays an important role in reserpine toxicity, likely by increasing extracellular dopamine concentrations.

**Keywords** Dopamine transporter · Neurodegeneration · Neurotoxicity · Parkinson's disease · Worm

### Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease, affecting ~1 % of population over the age of 55 (Lees et al. 2009). PD symptoms include bradykinesia, tremor, rigidity and abnormal postural reflexes. At the time of symptomatology, 80–90 % of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta are lost, resulting in reduced dopamine synthesis and release from striatal nerve terminals (Lang and Lozano 1998). The mechanisms underlying neurological alterations leading to progressive motor symptoms are poorly understood. The majority of PD cases are idiopathic in nature, and only 10 % have a known genetic linkage (Lees et al. 2009).

Animal models have proven highly informative in deciphering mechanisms associated with the etiology of PD. Reserpine is a monoamine depletory and it has been used in modeling PD etiology (see Beal 2001). Reserpine inhibits the vesicular monoamine transporter (VMAT), leading to loss of monoamine storage capacity. This model was instrumental in first demonstrating the therapeutic efficacy of what still remains the gold-standard treatment for

P. Reckziegel (✉) · R. Fachinetto  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil  
e-mail: patriciareckziegel@hotmail.com

P. Chen · S. Caito · M. Aschner (✉)  
Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Forchheimer 209, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA  
e-mail: michael.aschner@einstein.yu.edu

P. Gubert · F. A. A. Soares  
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

PD, L-DOPA (Carlsson et al. 1957). However, reserpine's effects on dopaminergic neurodegeneration have yet to be fully clarified.

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a powerful genetic model and has been extensively used to explore molecular mechanisms of xenobiotic-induced PD (Nass and Blakely 2003; Nass and Settivari 2008), such as 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) (Braungart et al. 2004), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Nass et al. 2002), rotenone or paraquat (Ved et al. 2005). Several characteristics make *C. elegans* an optimal model for neurodegenerative studies. It has only 320 neurons, eight of which are dopaminergic. The dopaminergic system in worms plays a role in several behaviors, including basal motor activity, egg-laying, defecation, sensation/response to food sources and habituation to touch (for review, see McDonald et al. 2007). At the molecular level, *C. elegans* harbors all genes (most of them are orthologues to vertebrates) for dopamine synthesis, packaging, release, reuptake and signaling (McDonald et al. 2007). In addition, worms are transparent, thus green fluorescent protein (GFP) expression under the dopamine transporter-1 (*dat-1*) promoter allows for in vivo visualization of the dopaminergic neurons (Nass et al. 2002; Nass and Settivari 2008). Furthermore, several mutant strains are available (Kuwahara et al. 2008), allowing the screening of mechanisms associated with drug-induced dopaminergic neurodegeneration.

The present study investigated reserpine's effects on the dopaminergic system exploring *C. elegans* behavior, morphologic and genetic properties. We hypothesized that the physiopathology of reserpine-induced parkinsonism involves dopaminergic toxicity caused by excess of extracellular dopamine.

## Methods

### Reagents

Reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

### *Caenorhabditis elegans* strains and handling

The following *C. elegans* strains were used: wild-type (WT) N2 (+); BY200, *dat-1::GFP(vtIs1)* V; RM2702, *dat-1(ok157)* III; CB1111, *cat-1(e1111)* X; CB1112, *cat-2(e1112)* II; LX636, *dop-1(vs101)*; LX702, *dop-2(vs105)*; LX703, *dop-3(vs106)*; RB1254, *dop-4(ok1321)*; VP596 (dvIs19[pAF15(*gst-4::GFP::NLS*);vIs33[*dop-3::RFP*]). The VP596 strain was provided by Dr. Keith P. Choe (University of Florida, USA), and the other strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA).

*Caenorhabditis elegans* strains were handled and maintained at 20 °C as previously described (Brenner 1974). Gravid worms were maintained in 8P plates with NA22 bacteria and synchronized with hypochlorite solution (3.75 mL sterile water, 1 mL household bleach and 250  $\mu$ L 10 N NaOH for 0.5 mL gravid worms). The remaining eggs were isolated with a 30 % sucrose gradient, washed with sterile water and resuspended in M9 buffer. Cultures were shaken at 24 rpm at 20 °C. After 13 h, synchronized L1 worms were used for the reserpine exposures, as described below.

### Reserpine exposure

The reserpine exposure protocol was based on methodology described by Arya et al. (2009) and Srivastava et al. (2008). Reserpine stock solution (50 mM) was prepared in acetic acid) was diluted in distilled water and poured over the surface of nematode growth medium (NGM) agar plates with *Escherichia coli* OP50 strain at final reserpine concentrations of 30 or 60  $\mu$ M. Plates at 0.025 % acetic acid (reserpine vehicle) were used as control plates. Plates were allowed to dry and used 1 day after plating.

Synchronized L1 worms were transferred to control or reserpine (30 and 60  $\mu$ M) plates. Adult worms were transferred each day to new plates. Reserpine exposure lasted for different days until the maximum of 8 days. Some reserpine-exposed animals were transferred to normal OP50-seeded NGM plates on day 4 of reserpine exposure for analysis. Furthermore, for several assays, worms were exposed to reserpine or vehicle from their L1 larval stage throughout their adulthood (3 days for control and the 30  $\mu$ M reserpine groups and 4 days for the 60  $\mu$ M reserpine group). This difference in the exposure times was driven by observations in the development assay, indicating in that worms exposed to 60  $\mu$ M reserpine required an extra larval day to reach the adult stage. Worms were used for the following assays.

### Survival assay

20–30 synchronized L1 worms [WT N2, BY200 (*dat-1::GFP(vtIs1)*) or *cat-1* (*cat-1(e1111)*), *cat-2* (*cat-2(e1112)*), *dat-1* (*dat-1(ok157)*), *dop-1* (*dop-1(vs101)*), *dop-2* (*dop-2(vs105)*), *dop-3* (*dop-3(vs106)*) and *dop-4* (*dop-4(ok1321)*) loss-of-function mutants] were transferred to individual 35 mm plates with vehicle or reserpine. Live worms were counted daily for 4 days. Each experiment was performed in triplicate (3 plates with 20–30 worms each) and in at least four independent worm preparations. Scores were normalized to percent of worms plated on day 0.



## Developmental assay

Under normal conditions (when food is present and temperature is near 20 °C), worms proceed through a series of molts, entering the second, third and fourth larval stages (L2, L3, and L4, respectively), prior to becoming adults capable of laying their own eggs (Hope 1999). Twenty to thirty synchronized L1 WT N2 worms were exposed to reserpine or vehicle for 4 days in 35 mm plate. The larval stage was determined every 24 h by their morphology. Scores were normalized to the percent of worms on each plate. Each experiment was carried out in triplicate (three plates with 20–30 worms each) in six independent worm preparations ( $n = 6$ ).

## Pharyngeal pumping

The *C. elegans* feeding rate can be measured by the number of contraction–relaxation cycles (pumps) exhibited by the pharyngeal muscle, the worm's feeding organ (Avery 1993). Synchronized L1 WT N2 worms were exposed to reserpine or vehicle for 4 days. On day 3 and 4 of exposure, reserpine's effect on feeding rates on bacterial lawn was recorded according to Wang et al. (2008). Pharyngeal bulb contractions in each animal were counted in triplicate at 10-s intervals. Results were normalized per minute. Each experiment was carried out with 10 worms in four independent worm preparations ( $n = 4$ ).

## Defecation behavior

The interval between defecation cycles of synchronized L1 WT N2 worms exposed for 3 or 4 days to reserpine or vehicle was measured according to Wang et al. (2008). For each worm, defecation cycles were counted three times. Each experiment was carried out with 10 worms in four independent worm preparations ( $n = 4$ ).

## Egg laying and egg production

Egg laying and egg production were used to evaluate the reproductive state of the worms. Synchronized L1 WT N2 worms were exposed to reserpine or vehicle for 4 days. On day 3 and 4, individual gravid adults were transferred to NGM agar plates and allowed to lay eggs for 2 h (Schafer and Kenyon 1995; Wang et al. 2008). The next day, the progeny number was counted as a measure of number of eggs laid per worm. To assess the number of eggs inside the uterus (egg production), worms were burst with bleach solution and the number of released eggs counted. Egg laying and egg production experiments were carried out with 10 worms each in four independent worm preparations ( $n = 4$ ).

## Locomotor rate

Dopamine-containing neural circuit mediates locomotor rate of *C. elegans*. Accordingly, well-fed animals with normal dopamine contents move more slowly in the presence of bacteria than in the absence of bacteria (Sawin et al. 2000). Here this basal slowing response (or food-sensing response) was assayed as described (Sawin et al. 2000) in L1 synchronized WT N2 worms exposed to reserpine for 3, 4 or 8 days, or for 4 days followed by 4 days on normal NGM agar plates. *cat-2(e1112)* loss-of-function mutants, in which the tyrosine hydroxylase activity is abolished, resulting in the absence of dopamine synthesis, were used as positive controls. Worms were transferred to NGM agar plates in the presence or absence of an OP50 bacteria ring, and the number of body bends was counted during 20 s 5 min after transferred. Each experiment was carried out with five worms in six independent worm preparations ( $n = 6$ ).

## Dopamine content analysis

L1 synchronized WT N2 worms were exposed to reserpine or vehicle throughout their adulthood (3 days for control and the 30  $\mu$ M reserpine groups and 4 days for the 60  $\mu$ M reserpine group). Next, they were washed off the plates several times with M9. 200,000 worms per group were pelleted in a tube and the supernatant removed. Tubes were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C. Dopamine content was measured with high-performance liquid chromatography (HPLC) according the method described by Benedetto et al. (2010). Each experiment was performed with 200,000 worms in four independent worm preparations ( $n = 4$ ).

## GFP fluorescence quantification

Here we used the BY200 strain, which expresses GFP under the control of the dopamine re-uptake transporter 1 promoter, *dat-1::GFP(vtIs1)*. L1 synchronized BY200 worms were exposed to vehicle or reserpine throughout adulthood (3 days for control and the 30  $\mu$ M reserpine groups and 4 days for the 60  $\mu$ M reserpine group). Ten to fifteen reserpine-exposed worms were mounted on 4 % agarose slides and were anaesthetized with 0.2 % tricaine/0.02 % tetramisole. GFP fluorescence in dopaminergic cephalic (CEP) neurons of five randomly chosen worms was captured with a Plan-Apochromat 20 $\times$  objective on a LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Inc) as previously described (Benedetto et al. 2010; Caito et al. 2013). Images were processed with the Zeiss LSM Image Browser. GFP fluorescence quantification was performed using ImageJ 1.36 software as previously described (Gavet and Pines 2010). Each experiment was performed

with five worms in seven independent worm preparations ( $n = 7$ ).

#### Neurodegeneration assay

BY200 worms were exposed to vehicle or 30 or 60  $\mu\text{M}$  reserpine for 3, 4 or 8 days, respectively. Worms were transferred to normal NGM agar plates with OP50 on day 4. For the test, fifteen worms from each group were mounted on 4 % agarose pads and anesthetized with 0.2 % tricaine/0.02 % tetramisole. Neuronal defects in the CEP dopaminergic neurons were evaluated with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 801, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a Lambda LS Xenon lamp (Sutter Instrument Company) and Nikon Plan Fluor 20 $\times$  dry and Nikon Plan Apo 60  $\times$  1.3 oil objectives. Worms were considered to have intact CEP neurons when they did not show any shrunken soma or loss of dendrites or somas in any one of the four CEP neurons. Shrunken somas in CEP neurons were also counted. Each experiment was performed with 15 worms in five independent worm preparations ( $n = 5$ ). Confocal images acquired for illustration were captured through Plan-Apochromat 20 $\times$  objective on a LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Inc) scanning every 200 nm for XZ sections. Images were processed with the Zeiss LSM Image Browser.

#### RNA isolation and real-time polymerase chain reaction (PCR)

Synchronized L1 BY200 worms were exposed to reserpine for 8 days, or for 4 days followed by 4 days (recovery phase) on normal NGM agar plates. On day 4 and 8, about 200 worms per condition were washed with M9 and lysed in Trizol (Ambion) by freezing the worms in liquid nitrogen and thawing repeatedly four times at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The various phases were separated with chloroform (EMDchemicals), and the top phase was removed into a microcentrifuge tube and precipitated in isopropanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Two  $\mu\text{l}$  glycogen (Ambion) was added before isopropanol to allow RNA pellet easy viewing. After precipitation, the RNA was washed in 75 % ethanol and resuspended in RNase-free water. RNA concentration was measured by NANODROP 2000 (Thermo Scientific) and an equal RNA amount was converted to cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Real-time PCR was performed in CFX96 real-time system (Bio-Rad). cDNAs from the above were used as templates, and pre-designed TaqMan primer sets (Applied Biosystems) were used to detect *C. elegans ama-1* (Ce02462735\_g1), *dat-1* (Ce02450891\_g1) and *GFP* (Mr03989638\_mr) expression. All the real-time PCRs were performed in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  1X of the TaqMan

Universal PCR Master mix (Applied Biosystems). Each experiment was carried out with 200 worms in four independent worm preparations ( $n = 4$ ).

#### Acute dopamine treatment

L1 synchronized N2 WT worms were acutely pretreated for 10 min with 10 mM dopamine or M9 (vehicle), according to Benedetto et al. (2010). Immediately thereafter, worms were transferred to NGM agar plates with vehicle or reserpine. Their survival was measured daily for 4 days. Each experiment was performed in triplicate (3 plates with 20–30 worms in each) in six independent worm preparations ( $n = 6$ ).

#### Relative *Pgst-4::GFP* fluorescence intensity

For this experiment, we used the transgenic VP596 line, which expresses one fluorescent construct to monitor glutathione-S-transferases (GSTs) and another as a standard for worm number normalization (*Pgst-4::GFP* and *Pdop-3::RFP*, respectively). Worms were exposed to vehicle or reserpine from L1 larval stage throughout adulthood (3 days for control and 30  $\mu\text{M}$  reserpine groups and 4 days for 60  $\mu\text{M}$  reserpine group). Next, they were washed several times with M9 and S-buffer and transferred to a 384 microplate (200 worms per well, five wells per condition). GFP and RFP fluorescences were quantified according to Leung et al. (2011) (filters: GFP 485/20ex 528/20em; RFP 540/25ex 590/35em), and their ratio was calculated. Since *gst-4* is inducible by reactive oxygen species, its fluorescence intensity was taken as a marker for oxidative stress in the living worms (Kampkötter et al. 2007). Each experiment was performed with five wells with 200 worms per well, and repeated independently eight times.

#### Statistics

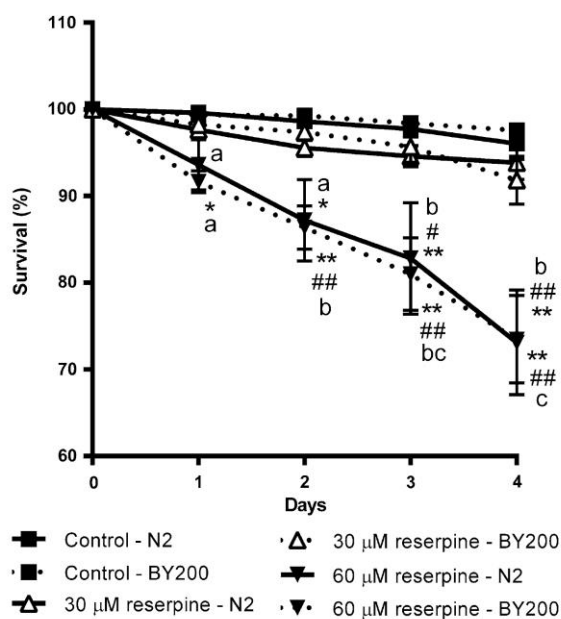
All statistical analyses were performed with Prism 6 (Graphpad software, La Jolla, CA, USA); three-way ANOVA was performed with Statistica 9 (Statsoft software, Tulsa, OK, USA). Data were analyzed by one, two or three-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test where appropriate. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Reserpine decreases worm survival (Fig. 1)

Survival of WT N2 and BY200 worms exposed to reserpine was evaluated daily for 4 days. The results show a



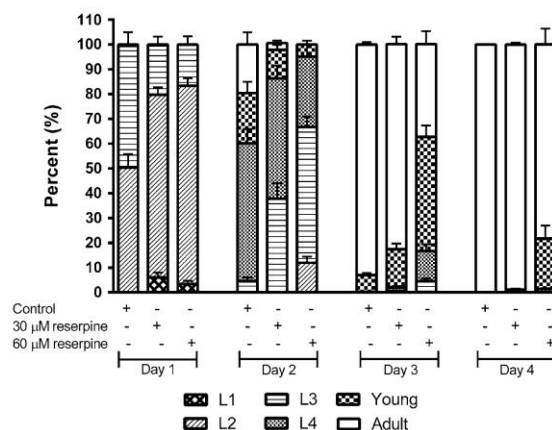


**Fig. 1** Effect of reserpine on survival in WT N2 and BY200 worms. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Different letters show differences between the same strains on different days. \*Differences between groups on the same day; #Different of control group,  $p < 0.05$ ; \*\*Different of control group,  $p < 0.001$ ; #Different of 30  $\mu\text{M}$  reserpine group,  $p < 0.05$ ; ##Different of 30  $\mu\text{M}$  reserpine group,  $p < 0.001$

significant interaction for the reserpine dose by exposure duration in WT N2 worms [ $F(2, 90) = 21.77$ ,  $p < 0.0001$ ;  $F(4, 90) = 8.531$ ,  $p < 0.0001$ , respectively], as well as an interaction between reserpine and exposure duration [ $F(8, 75) = 5.501$ ,  $p < 0.0001$ ]. Sixty  $\mu\text{M}$  reserpine decreased the survival of BY200 worms relative to controls after 1 day exposure, and after 2 days in WT N2 worms, showing dose- and time-dependent effects. Sixty  $\mu\text{M}$  reserpine-exposed worms' survival on day 4 was around 73 % of the control values. No differences were found between different strains. BY200 was used as a control strain expressing GFP.

#### Reserpine causes developmental delay (Fig. 2)

The larval stage of WT N2 worms exposed to reserpine was evaluated daily for 4 days. We performed statistics comparing the larval stages of worms exposed to vehicle or 30  $\mu\text{M}$  reserpine for 3 days or to 60  $\mu\text{M}$  reserpine for 4 days. One-way ANOVA showed a significant effect of larval stage [ $F(1, 30) = 95.93$ ,  $p < 0.0001$ ], and post hoc analysis showed that, upon the described exposures, plates had a prevalence of adult worms in relation to other larval stages. Thus, while the control and 30  $\mu\text{M}$  reserpine groups



**Fig. 2** Effect of reserpine on the development of WT N2 worms. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Worms got adults after exposure to vehicle or 30  $\mu\text{M}$  reserpine for 3 days and 60  $\mu\text{M}$  reserpine for 4 days

are in the adult stage on day 3, the 60  $\mu\text{M}$  reserpine group reaches adulthood on day 4 of reserpine exposure.

#### Reserpine affects pharyngeal pumping, defecation and egg laying (Table 1)

Reserpine showed a significant effect on pharyngeal pumping [ $F(2, 18) = 20.10$ ,  $p < 0.0001$ ], reducing the rate on day 3 and 4 (30 or 60  $\mu\text{M}$ ). Moreover, both the reserpine dose and exposure duration showed a significant effect on defecation cycles [ $F(2, 18) = 3.77$ ,  $p = 0.043$ ;  $F(1, 18) = 4.96$ ,  $p = 0.038$ , respectively]. Exposure duration showed a significant effect on egg production [ $F(1, 18) = 4.61$ ,  $p = 0.046$ ], and the dose showed a significant effect on egg laying [ $F(2, 18) = 4.73$ ,  $p = 0.022$ ]; however, no differences were found between experimental groups.

Reserpine decreases *C. elegans* locomotor rate on food, and this effect is not recapitulated after the termination of reserpine exposure (Fig. 3)

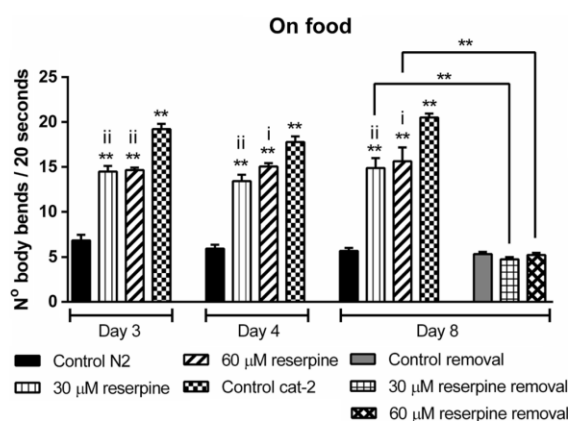
The number of body bends in reserpine-exposed worms was counted in the presence and absence of food on day 3, 4 or 8. No statistically significant effects of reserpine were found on locomotor rate when the test was performed in plates in the absence of bacteria (data not shown). However, in the presence of a food ring, reserpine showed a significant dose effect [ $F(2, 45) = 92.59$ ,  $p < 0.0001$ ], increasing the number of body bends compared with controls at each of the experimental doses and exposure days.

Next, we evaluated the effect of reserpine withdrawal on the locomotor rate on food. Two-way ANOVA showed a significant effect of the dose of reserpine [ $F(2, 30) = 22.18$ ,

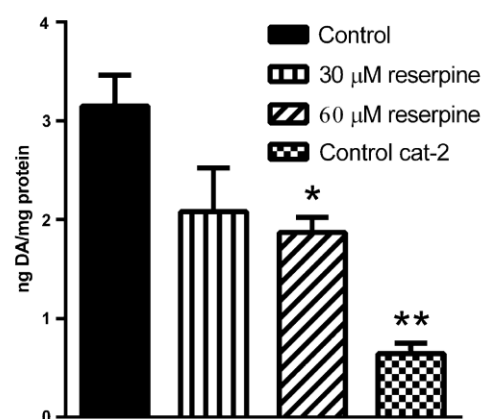
**Table 1** Effects of reserpine on pharyngeal pumping, defecation time, egg production and egg laying of WT N2 worms

	Day 3			Day 4		
	Control	30 $\mu$ M reserpine	60 $\mu$ M reserpine	Control	30 $\mu$ M reserpine	60 $\mu$ M reserpine
Pharyngeal pumping/min	232.1 $\pm$ 5.6	203.6 $\pm$ 1.2*	199.1 $\pm$ 6.1*	244.6 $\pm$ 7.6	211.5 $\pm$ 4.6*	203.0 $\pm$ 9.2**
Defecation cycles (s)	54.9 $\pm$ 0.6	58.1 $\pm$ 2.3	52.0 $\pm$ 1.8	64.8 $\pm$ 4.7	64.6 $\pm$ 4.3	53.7 $\pm$ 3.9
Eggs/worm	16.2 $\pm$ 0.1	15.5 $\pm$ 1.3	13.2 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 1.7	18.1 $\pm$ 1.3	18.3 $\pm$ 1.8
Number of laid eggs/worm/2 h	14.7 $\pm$ 1.2	11.9 $\pm$ 1.1	9.5 $\pm$ 1.3	12.4 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 1.1	10.0 $\pm$ 0.8

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \* Difference of control group in same day,  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$



**Fig. 3** Effect of reserpine on locomotor rate on food of WT N2 worms and *cat-2* loss-of-function mutants. Worms were exposed to reserpine from the L1 larval stage for 8 days. Some worms were removed from the reserpine-containing plates on day 4 and transferred to normal NGM plates. \*Significant difference from control or indicated group on the same day; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ . <sup>i</sup>Difference from *cat-2* group: <sup>i</sup> $p < 0.05$ ; <sup>ii</sup> $p < 0.001$



**Fig. 4** Dopamine levels in WT N2 worms exposed to reserpine or vehicle throughout adulthood. *cat-2* loss-of-function mutants were exposed to control plates. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*Significant difference of control group,  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

$p < 0.0001$ ], reserpine removal [ $F(1, 30) = 112.8$ ,  $p < 0.0001$ ] and an interaction between reserpine dose plus reserpine withdrawal [ $F(2, 30) = 25.39$ ,  $p < 0.0001$ ]. Reserpine (30 or 60  $\mu$ M) increased the locomotor rate of worms after 3, 4 or 8 days of reserpine exposure compared with controls. However, after 4 days of reserpine withdrawal, the reserpine-exposed worms recovered and their locomotor rate was indistinguishable from controls.

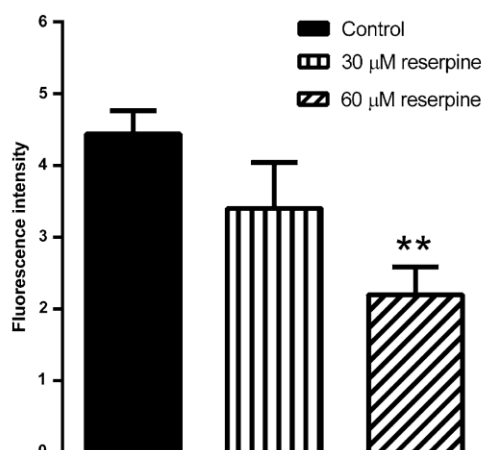
One-way ANOVA comparing WT N2 and *cat-2* loss-of-function mutants showed a significant strain effect on day 3, 4 or 8 of reserpine exposure [ $F(3, 20) = 86$ ,  $p < 0.0001$ ;  $F(3, 20) = 85.47$ ,  $p < 0.0001$ ; and  $F(3, 20) = 39.59$ ,  $p < 0.0001$ , respectively]. *cat-2* loss-of-function mutants showed higher locomotor rate on food than WT N2 controls and reserpine-exposed worms for all days of analysis.

Reserpine decreases dopamine levels (Fig. 4)

Dopamine content was analyzed by one-way ANOVA and showed decreased dopamine levels in WT N2 worms exposed for 4 days to 60  $\mu$ M reserpine versus controls [ $F(3, 12) = 13.01$ ,  $p < 0.0004$ ]. *cat-2* loss-of-function mutants also showed reduced dopamine levels compared to controls.

Reserpine decreases the fluorescence intensity of CEP dopaminergic neurons in BY200 worms (Fig. 5)

One-way ANOVA showed decreased [ $F(2, 17) = 6.495$ ,  $p < 0.05$ ] fluorescent intensity in CEP dopaminergic neurons in adult BY200 worms exposed to 60  $\mu$ M reserpine from the L1 larval stage versus controls.



**Fig. 5** Effect of reserpine on fluorescence intensity of CEP dopaminergic neurons in BY200 worms. BY200 worms were exposed to reserpine through adulthood (3 days of exposure for controls and 30  $\mu\text{M}$  reserpine groups, and 4 days of exposure for 60  $\mu\text{M}$  reserpine group). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*\*Difference of control group,  $p < 0.001$

Reserpine decreases the number of worms with intact CEP neurons and increases the number of shrunken soma in BY200 worm—worms fully recover from these effects upon reserpine withdrawal (Fig. 6)

CEP dopaminergic neuron morphology in BY200 worms was evaluated after 3, 4 or 8 consecutive days of reserpine exposure, as well as in worms exposed to reserpine for 4 days followed by 4 days of recovery (in absence of reserpine exposure). Two-way ANOVA showed a significant dose effect [ $F(2, 31) = 63.72, p < 0.0001$ ] and no effect of exposure duration. Reserpine decreased the number of intact CEP neurons versus controls on days 3, 4 or 8 of reserpine exposure. In addition, two-way ANOVA showed a significant interaction between reserpine's dose and withdrawal of the drug [ $F(2, 22) = 55.36, p < 0.0001$ ]. After 4 days of withdrawal, worms showed normal morphology in CEP neuron morphology that was indistinguishable from controls (Fig. 6b).

Reserpine also showed a significant effect on the number of shrunken somas per worm [ $F(2, 32) = 64.07, p < 0.0001$ ], after 3, 4 or 8 day exposures. Two-way ANOVA showed a statistically significant interaction was noted for treatment by withdrawal [ $F(2, 23) = 28.61, p < 0.0001$ ] after 8 days, with worms removed from reserpine on day 4 showing indistinguishable morphology on day 8 versus controls (Fig. 6d).

Reserpine increases *dat-1* gene and GFP expressions in BY200 worms (Fig. 7)

Two-way ANOVA showed a significant dose effect on *dat-1* gene expression [ $F(2, 18) = 23.61, p < 0.0001$ ] in the absence of exposure duration effect. Reserpine increased *dat-1* gene expression in BY200 worms after 4 or 8 days of exposure versus controls. Furthermore, two-way ANOVA showed an interaction between reserpine dose and reserpine withdrawal from exposure [ $F(2, 18) = 6.283, p < 0.00085$ ]. Four days after 4 days of reserpine exposure, worms showed *dat-1* gene expression levels indistinguishable from controls.

GFP expression showed analogous results for *dat-1* gene expression. Two-way ANOVA showed a significant dose effect [ $F(2, 18) = 41.56, p < 0.0001$ ] on GFP expression in reserpine-exposed worms. BY200 worms showed increased GFP expression levels compared to controls after 4 or 8 of reserpine exposure. In addition, two-way ANOVA showed a statistically significant interaction was noted for the reserpine dose by withdrawal [ $F(2, 18) = 13.18, p = 0.0003$ ]. Worms removed from reserpine and transferred to normal NGM plates on day 4 showed GFP expression levels that were indistinguishable from controls on day 8.

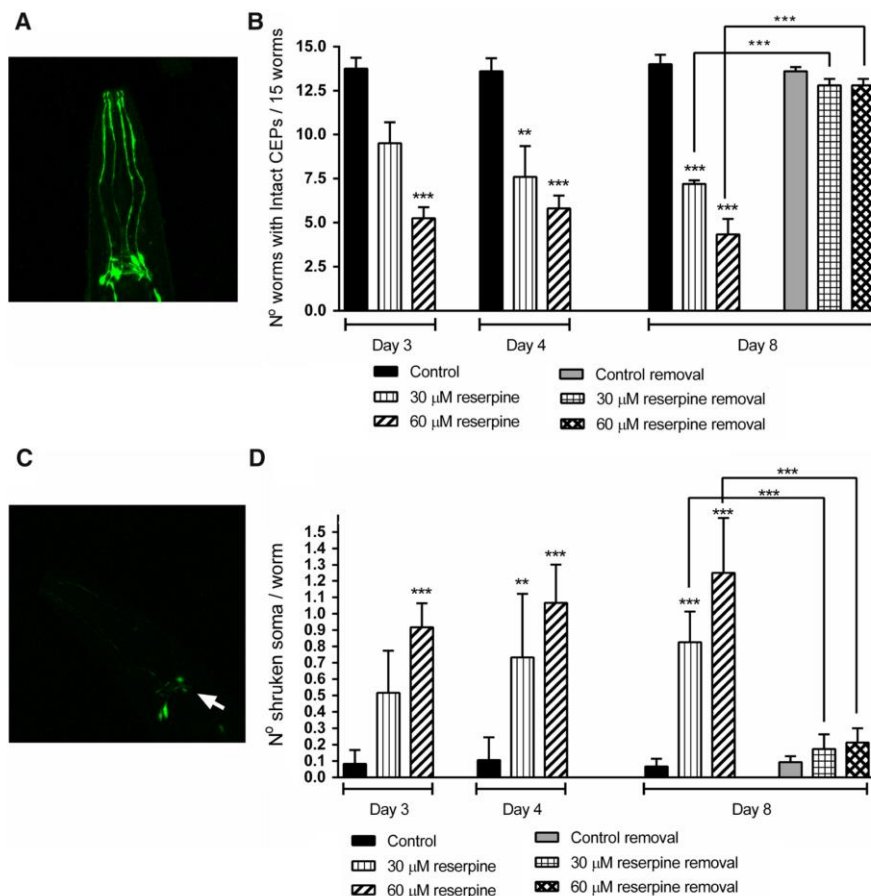
Loss-of-function mutants for vesicular monoamine transporter (*cat-1*) and for dopamine transporter (*dat-1*) are more sensitive to reserpine than WT N2 worms (Fig. 8)

Two-way ANOVA showed an interaction between time and strain [ $F(32, 184) = 3.131, p < 0.0001$ ]. Exposure duration and strain showed a significant effect upon exposure to 30  $\mu\text{M}$  reserpine [ $F(4, 173) = 1.25, p < 0.0001, F(7, 173) = 18.77, p < 0.0001$ , respectively]. Exposure to 60  $\mu\text{M}$  reserpine showed an interaction between exposure duration and strain [ $F(28, 155) = 2.61, p < 0.0001$ ]. Tukey's multiple comparison's test showed that reserpine (30 and 60  $\mu\text{M}$ ) decreased the survival of *cat-1* and *dat-1* loss-of-function mutants compared to WT N2 worms (Fig. 8a). No differences were observed between WT N2 worms and *cat-2, dop-1, dop-2, dop-3* or *dop-4* loss-of-function mutants exposed to reserpine or vehicle.

Furthermore, statistical analyses were separately performed for *cat-1* and *dat-1* loss-of-function mutants. Two-way ANOVA was performed to assess survival in reserpine-exposed *cat-1* loss-of-function mutants assessing the reserpine dose and exposure duration as dependent variables. As result, two-way ANOVA showed a statistically significant interaction was noted for the reserpine dose by exposure duration [ $F(8, 45) = 5.613, p < 0.0001$ ]. A significant interaction was also observed for the survival in *dat-1* loss-of-function mutants [ $F(8, 70) = 4.696, p < 0.0001$ ]. Reserpine (30 and 60  $\mu\text{M}$ ) decreased the survival of *cat-1*



**Fig. 6** Effects of reserpine on CEP dopaminergic neuron morphology in BY200 worms. L1-synchronized worms were exposed to reserpine for 4 days followed by 4 days in normal NGM plates. **a** Shows a representative picture of four intact CEP neurons in a BY200 worm. **b** The number of worms with intact CEP neurons (without shrunken soma or lost) per 15 analyzed worms. **c** The arrow shows a representative shrunken soma. **d** The data of the number of shrunken somas per worm. \*\*Difference of control or indicated group on the same day, \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$



and *dat-1* loss-of-function mutants in relation to controls since the first day of exposure for 4 days (Fig. 8b).

Dopamine pretreatment sensitizes worms to reserpine exposure (Fig. 9)

Three-way ANOVA showed a significant interaction between the reserpine dose and pre-dopamine treatment [ $F(2, 120) = 19.37, p < 0.0001$ ], reserpine dose and exposure duration [ $F(6, 120) = 16.58, p < 0.0001$ ] and dopamine pretreatment and exposure duration [ $F(3, 120) = 4.20, p = 0.0072$ ]. 60  $\mu$ M reserpine-exposed worms showed lower survival rate versus controls on day 1, 2, 3 and 4; moreover, dopamine pretreatment further decreased the survival of these worms. In addition, 60  $\mu$ M reserpine induced a time-dependent reduction in worms' survival.

Reserpine activates *gst-4* (Fig. 10)

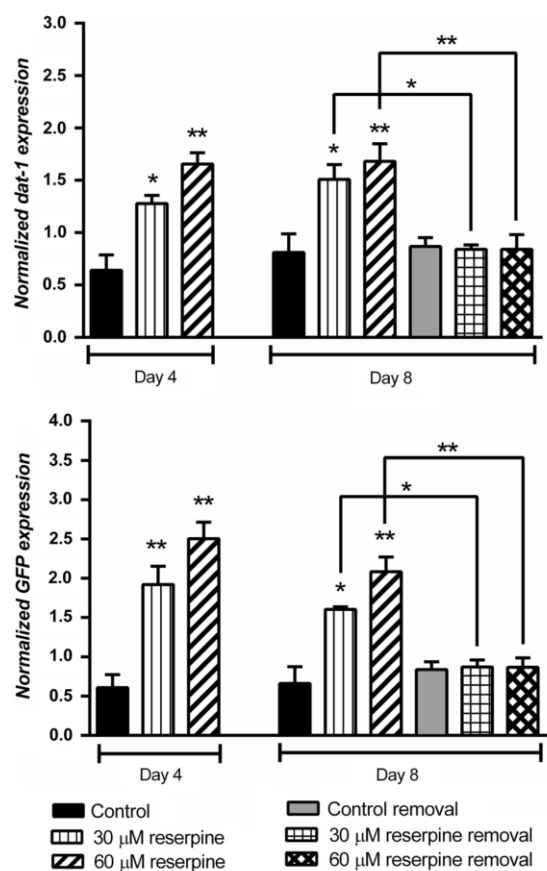
One-way ANOVA showed a significant effect of the reserpine dose on relative P*gst-4*::GFP fluorescence intensity in

VP596 worms [ $F(2, 21) = 7.283, p = 0.004$ ]. 60  $\mu$ M reserpine induced an increase in this parameter.

## Discussion

The present study observed decreased survival, development and feeding, as well as alterations in reproductive and defecation characteristics in reserpine-exposed worms. Increased locomotor rate on food was accompanied by reduced dopamine levels in reserpine-exposed worms versus controls, analogous to *cat-2* worms, which lack tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in dopamine synthesis. Analysis of dopaminergic CEP neurons in reserpine-exposed BY200 worms showed reduced fluorescence, decreased number of worms with intact neurons and increased shrunken soma number per worm. Moreover, reserpine increased *dat-1* gene expression. Decreased survival of VMAT or *dat-1* loss-of-function mutants versus WT controls was observed upon reserpine exposure, as well as to worms pre-exposed to sublethal dose of





**Fig. 7** Effect of reserpine on *dat-1* gene and GFP expressions in BY200 worms. Reserpine-induced effects were reversible when reserpine exposure was terminated on day 4. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*Significant difference from control or indicated group on same day \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

dopamine. Reserpine also activated GSTs. Finally, dopaminergic neurons recovered their normal morphology upon reserpine removal, as well as locomotor rate on food and *dat-1* gene expression. These data provide novel understanding on reserpine's effects on the dopaminergic system, delineating mechanisms associated with reserpine-induced parkinsonism.

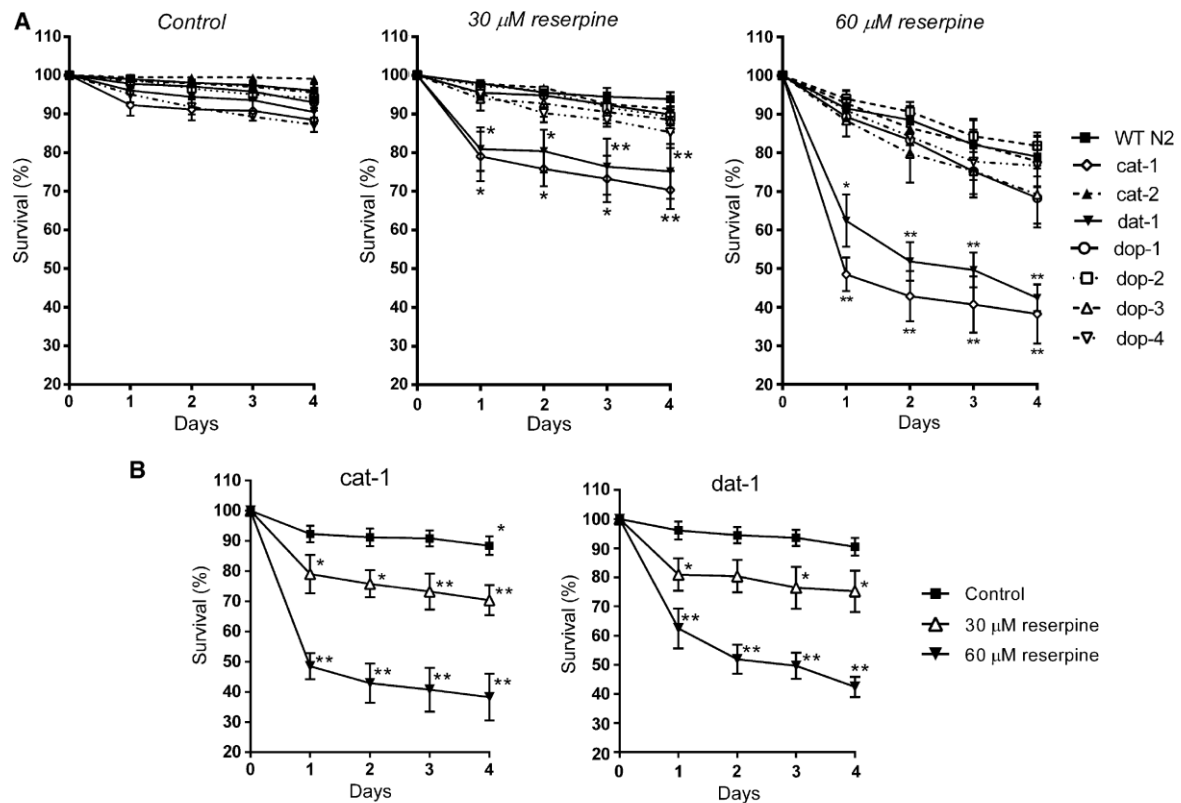
PD affects a large number of people around world, and animal models have been instrumental in deciphering PD pathophysiology. Reserpine recapitulates various aspects of PD, as it decreases dopamine levels and causes motor deficits (Duty and Jenner 2011). In addition, reserpine depletes all monoamines. It is noteworthy that in addition to dopamine (Jellinger 1991), other monoaminergic systems are affected in PD. The present study evaluated reserpine effects on the dopaminergic system in *C. elegans*, taking advantage of the nematode as a complimentary animal testing platform.

First, reserpine's general toxicity was assessed in worms. Reserpines dose- and time-dependently decreased survival in WT N2 and BY200 worms (Fig. 1), corroborating earlier observation (Arya et al. 2009; Saharia et al. 2012; Srivastava et al. 2008; Tauffenberger et al. 2013). Moreover, reserpine delayed the worms' development (Fig. 2), decreased their feeding rate, and altered defecation cycles and egg laying (Table 1). Our findings corroborate those by Srivastava et al. (2008), who reported that 30  $\mu\text{M}$  reserpine exposure positively modulated development, pharyngeal pumping and broodsize in worms. Alterations in survival, development, defecation and egg laying may be a consequence of decreased feeding (Papaioannou et al. 2005), a complex behavior controlled by several neurotransmitters, such as serotonin, acetylcholine and glutamine (Papaioannou et al. 2005). However, it is not feasible to correlate the decreased survival just with decreased pharyngeal pumping since decreased pharyngeal pumping per se may increase worms' life span (Huang and Kornfeld 2004).

Decreased locomotor rate on food reflects the worm's ability to sense the presence of food and adjust its locomotor activity to allow for its consumption (Sawin et al. 2000). This behavior is mediated exclusively by a dopamine-mediated neural circuit, and the behavior is lost in *cat-2(e1112)*, a mutant strain deficient in tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme for dopamine biosynthesis (Sawin et al. 2000). Reserpine-exposed worms increased their locomotor rate on food in comparison with controls (Fig. 3), consistent with Duerr et al. (1999), suggesting alterations in the dopaminergic system. Measurement of dopamine levels showed that 60  $\mu\text{M}$  reserpine-exposed worms and *cat-2* loss-of-function mutants had reduced dopamine levels versus controls (Fig. 4), analogous to findings in reserpine-treated rodents (see review Duty and Jenner 2011). These reduced dopamine levels appear to be related to reserpine's inhibition of VMAT.

*Caenorhabditis elegans* dopamine neurons are sensitive to neurotoxins and pesticides, including 6-OHDA (Nass et al. 2002), MPP<sup>+</sup> (Braungart et al. 2004) and rotenone or paraquat (Ved et al. 2005). Here, we report for the first time morphological alterations induced by reserpine in worm dopamine neurons. Reserpine decreased GFP fluorescence intensity of CEP dopaminergic neurons in BY200 worms (Fig. 5), consistent with Sulston et al. (1975). Furthermore, reserpine increased the number of shrunken soma and decreased the number of worms with intact CEP neurons (Fig. 6). These neurodegenerative effects were observed concomitant to increased *dat-1* gene expression (Fig. 7), confirming reserpine-induced neuronal damage.

Interestingly, morphological alterations induced by 4-day reserpine exposure in dopamine neurons were not observed when worms were removed from reserpine for the 4 subsequent days (Fig. 6). Thus, dopaminergic neurons



**Fig. 8** Survival of dopaminergic protein loss-of-function mutants exposed to reserpine. *Cat-1* represents worms with loss-of-function of the vesicular monoamine transporter-2; *cat-2* of tyrosine hydroxylase; *dat-1* of dopamine transporter; *dop-1* and *dop-4* of dopaminergic like-D1 receptors; *dop-2* and *dop-3* of dopaminergic like-D2 receptors. **a** *Cat-1* and *dat-1* loss-of-function mutants are more sensitive to

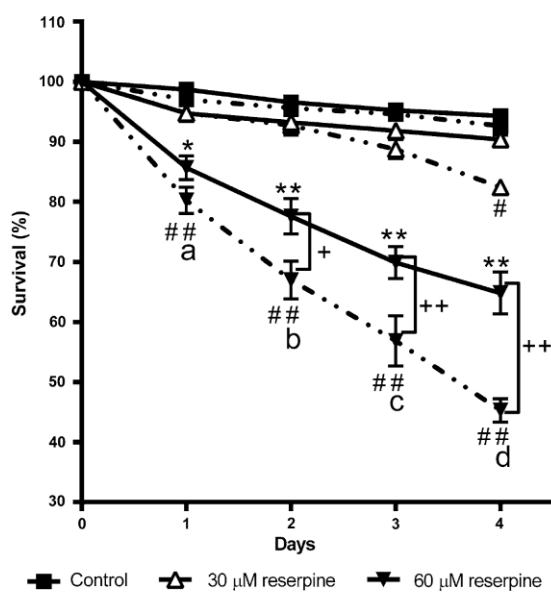
reserpine exposure than WT N2 ones. \*Express difference of WT N2 worms exposed to vehicle or reserpine for the same time (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ). **b** Reserpine decreases survival of *cat-1* and *dat-1* loss-of-function mutants after 1 day of exposure. \*Different of day 0,  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

recovered their normal morphology upon reserpine withdrawal. In agreement, although reserpine produces parkinsonian signs, its effects are transient and they fail to elicit dopamine neuronal death (see Duty and Jenner 2011). Notably, the neuronal morphology after reserpine withdrawal recovered, dopaminergic transmission was restored and worms showed normal locomotor rate on food (Fig. 3), as well as normal *dat-1* gene expression levels (Fig. 7).

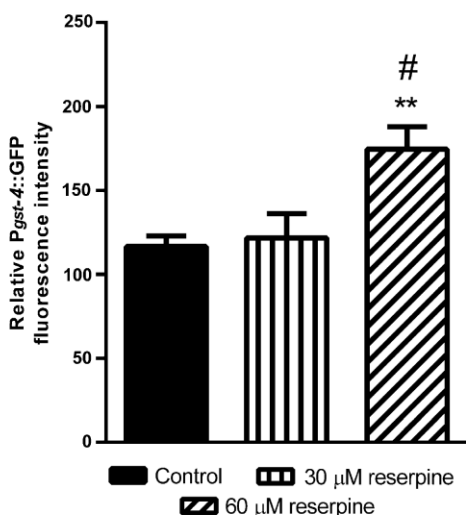
Loss-of-function mutants of genes related to dopamine synthesis (*cat-2*), storage (*cat-1*), dopaminergic receptors (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3* and *dop-4*) and dopamine transporter (*dat-1*) were exposed to reserpine and their survival evaluated. Reserpine decreased the survival of VMAT loss-of-function mutant (*cat-1* mutant) versus WT worms (Fig. 8), corroborating its monoamine depletory action via VMAT blockage. Moreover, *dat-1* loss-of-function mutant were more sensitive to reserpine versus WT worms (Fig. 8), showing that the dopamine transporter is also detrimental

to survival of reserpine-exposed worms. This observation demonstrates for the first time the ability of reserpine to interfere with dopamine transporter. It is noteworthy that PD brains showed a 50–70 % loss of the dopamine transporter (Seeman and Niznik 1990), consistent with experimental models of dopaminergic toxicity, including Mn (Benedetto et al. 2010) and antipsychotics (Fachinetti et al. 2007a, b).

Dopamine transporter is responsible for dopamine clearance at the synapse, removing excessive extracellular dopamine into presynaptic dopaminergic termini (Cass et al. 1993; Kilty et al. 1991; Shimada et al. 1991). Its inhibition or loss-of-function leads to high extracellular dopamine levels and ensuing neurotoxicity (Huotari et al. 2002; McDonald et al. 2007). Reserpine decreased the survival of *dat-1* loss-of-function mutant. In addition, reserpine-exposed worms that were pretreated with exogenous dopamine showed lower survival versus worms that were not



**Fig. 9** Effect of dopamine pretreatment (10 mM/10 min) on survival of WT N2 worms exposed to reserpine. The *dashed lines* represent the dopamine pre-exposed worms. Data were analyzed by three-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*Means different of control,  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; #Different of dopamine control,  $p < 0.05$ , ## $p < 0.001$ ; +Difference between worms pretreated or no to dopamine followed by 60 μM reserpine exposure,  $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.001$ ; different letters represent differences between days



**Fig. 10** Effect of reserpine on relative Pgst-4::GFP fluorescence in VP596 worms. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*\*Difference of control group  $p < 0.001$ ; #Difference of 30 μM reserpine group,  $p < 0.05$

pretreated with dopamine (Fig. 9). This shows that extracellular dopamine is also involved in reserpine's neurotoxicity. Notably, Hossain et al. (2013) reported that increased extracellular dopamine levels may occur concomitant with loss-of-function of the VMT-2 in *cat-1* mutant worms. Accordingly, reserpine may cause extracellular dopamine accumulation and toxicity by interfering with dopamine transporter function (Eyerman and Yamamoto 2007; Park et al. 2002).

Excessive dopamine can oxidize dopamine to generate unstable quinones, which are highly reactive and cause lipid peroxidation (Aluf et al. 2011). Dopaminergic cell loss in PD patients and experimental PD models invokes excessive reactive oxygen species production (Cassarino et al. 1997; Lotharius et al. 1999; Pong et al. 2000; Wu et al. 2003; Yoo et al. 2003). Skn-1 is the *C. elegans* homologue of nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2 (Nrf2), and it is constitutively expressed in dopaminergic neurons where it regulates a number of phase II detoxification enzymes including GSTs (VanDuyn et al. 2010). Reserpine dose dependently increased the relative Pgst-4::GFP fluorescence intensity in VP596 worms (Fig. 10). This result indicates that reserpine induced an activation of GSTs, likely reflecting a defense mechanism to reactive species generated from reserpine exposure.

In conclusion, reserpine decreased dopamine levels in worms by its well-described effect on blocking VMAT activity. In addition, we demonstrated that reserpine caused damages to dopaminergic neuron morphology, which are probably related to alterations on dopamine transporter that lead to increased extracellular dopamine levels and consequent neurotoxicity. These results provide new insights to PD pathophysiology and should facilitate the search for new therapeutic modalities; however, additional studies must be carried out to systematically evaluate the specific effects of reserpine on dopamine transporter function.

**Acknowledgments** This work was supported by National Institutes of Health grant R01 ES10563. We thank Dr. Keith P. Choe for use of the VP596 strain. Confocal images were obtained through the use of the Vanderbilt University Medical Center Cell Imaging Shared Resource. Neurochemistry was performed by the Vanderbilt University Center for Molecular Neuroscience's Neurochemistry Core Laboratory.

**Conflict of interest** None.

## References

- Aluf Y, Vaya J, Khatib S, Finberg JPM (2011) Alterations in striatal oxidative stress level produced by pharmacological manipulation of dopamine as shown by a novel synthetic marker molecule. *Neuropharmacology* 61:87–94



- Arya U, Dwivedi H, Subramaniam JR (2009) Reserpine ameliorates A $\beta$  toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 44:462–466
- Avery L (1993) The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 133:897–917
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325–334
- Benedetto A, Au C, Avila DS, Milatovic D, Aschner M (2010) Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 6:1–18
- Braungart E, Gerlach M, Riederer P, Baumeister R, Hoener MC (2004) *Caenorhabditis elegans* MPP<sup>+</sup> model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener Dis* 1:175–183
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94
- Caito SW, Valentine WM, Aschner M (2013) Dopaminergic neurotoxicity of *S*-ethyl *N*, *N*-dipropylthiocarbamate (EPTC), molinate, and *S*-methyl-*N*, *N*-diethylthiocarbamate (MeDETC) in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 127:837–851
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200
- Cass WA, Zahniser NR, Flach KA, Gerhardt GA (1993) Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. *J Neurochem* 61:2269–2278
- Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, Parks JP, Parker WD Jr, Bennett JP Jr (1997) Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1362:77–86
- Duerr JS, Frisby DL, Gaskin J, Duke A, Asermely K, Huddleston D, Eiden LE, Rand JB (1999) The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *J Neurosci* 19:72–84
- Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164:1357–1391
- Eyerman DJ, Yamamoto BK (2007) A rapid oxidation and persistent decrease in the vesicular monoamine transporter 2 after methamphetamine. *J Neurochem* 103:1219–1227
- Fachinnetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Avila DS, Burger ME, Calixto JB, Rocha JB, Ferreira J (2007a) *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1478–1486
- Fachinnetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, Braga AL, Calixto JB, Rocha JB, Ferreira J (2007b) Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* 194:423–432
- Gavet O, Pines J (2010) Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* 18:533–543
- Hope IA (1999) Background on *Caenorhabditis elegans*. In: Hope IA (ed) *C. elegans*: a practical approach. Oxford UP, New York, pp 1–15
- Hossain M, Wickramasekara RN, Carvelli L (2013) B-Phenylethylamine requires the dopamine transporter to increase extracellular dopamine in *Caenorhabditis elegans* dopaminergic neurons. *Neurochem Int* 73:27–31
- Huang CXC, Kornfeld K (2004) Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(21):8084–8089
- Huotari M, Santha M, Lucas LR, Karayiorgou M, Gogos JA, Månisto PT (2002) Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-*O*-methyltransferase-disrupted mice. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1309–1316
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153–197
- Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R (2007) Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and foxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol* 81:849–858
- Kilty JE, Lorang D, Amara SG (1991) Cloning and expression of a cocaine sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254:578–579
- Kuwahara T, Koyama A, Koyama S, Yoshina S, Ren CH, Kato T, Mitani S, Iwatsubo T (2008) A systematic RNAi screen reveals involvement of endocytic pathway in neuronal dysfunction in alpha-synuclein transgenic *C. elegans*. *Hum Mol Genet* 17:2997–3009
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044–1053
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373:2055–2066
- Leung CK, Deonaraine A, Strange K, Choe KP (2011) High-throughput screening and biosensing with fluorescent *C. elegans* strains. *J Vis Exp* 51:1–5
- Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL (1999) Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci* 19:1284–1293
- McDonald PW, Hardie SL, Jessen TN, Carvelli L, Matthies DS, Blakely RD (2007) Vigorous motor activity in *Caenorhabditis elegans* requires efficient clearance of dopamine mediated by synaptic localization of the dopamine transporter DAT-1. *J Neurosci* 27:14216–14227
- Nass R, Blakely RD (2003) The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:521–544
- Nass R, Settivari RS (2008) *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease: a robust genetic system to identify and characterize endogenous and environmental components involved in dopamine neuron degeneration. In: Nass R, Przedborski S (eds) *Parkinson's disease: molecular and therapeutic insights from model systems*. Elsevier Academic Press, New York, pp 347–360
- Nass R, Hall DH, Miller DM, Blakely RD (2002) Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3264–3269
- Papaioannou S, Marsden D, Franks CJ, Walker RJ, Holden-Dye L (2005) Role of a FMRF amide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 65:304–319
- Park SU, Ferrer JV, Javitch JA, Kuhn DM (2002) Peroxynitrite inactivates the human dopamine transporter by modification of cysteine 342: potential mechanism of neurotoxicity in dopamine neurons. *J Neurosci* 22:4399–4405
- Pong K, Doctrow SR, Baudry M (2000) Prevention of 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced nitration of tyrosine hydroxylase and neurotoxicity by EUK-134, a superoxide dismutase and catalase mimetic, in cultured dopaminergic neurons. *Brain Res* 881:182–189
- Saharia K, Arya U, Kumar R, Sahu R, Das CK, Gupta K, Dwivedi H, Subramaniam JR (2012) Reserpine modulates neurotransmitter release to extend lifespan and alleviate age-dependent A $\beta$  proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 47:188–197
- Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic



### 3.3 Dados Complementares

#### Materiais e Métodos

##### Animais

O projeto deste experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal UFSM (número 010/2012).

##### Determinação da atividade da MAO *in vitro*

A atividade da MAO foi determinada pela quantificação da oxidação da quinuramina a 4-hidroxiquinolina (4-HQ) (REIS et al., 2014; VILLARINHO et al., 2012). O cérebro total de ratos Wistar machos foi homogeneizado em tampão contendo 16.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,6 mM KCl, pH 7,4. Alíquotas do homogeneizado com 0,25 mg de proteína foram incubadas com tampão de homogeneização, 250 nM de pargilina (inibidor seletivo de MAO-B) ou 250 nM clorgilina (inibidor seletivo de MAO-A) a 37 °C por 5 minutos. Após, foi adicionado às amostras 60 mM de quinuramina para início da reação, a qual ocorreu por 30 minutos e foi finalizada pela adição de solução a 10 % de ácido tricloroacético ao meio. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 8 minutos e o sobrenadante adicionado a NaOH 1N (1:1). O produto da reação foi mensurado espectrofluorimetricamente a 315 nm de excitação e 380nm de emissão. O experimento foi repetido 3 vezes. Os resultados foram expressos em nmol of 4-HQ/min/mg of protein.

##### Western Blot

Para esse ensaio, utilizou-se metade de cada estriado dos animais tratados com reserpina e/ou AG (13,5 mg/kg/dia) do experimento descrito no Artigo 1.

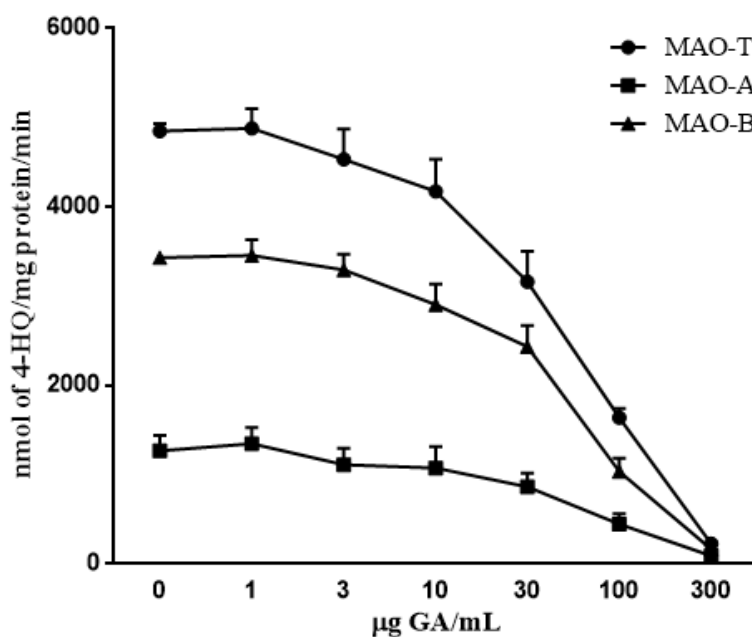
Meio estriado de cada rato foi homogeneizado em 400 µL de tampão de lise (SDS 4%, EDTA 2 mM, Tris 50 mM, Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 0,5 mM, aprotinina 2 µg/mL, benzamidina 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilenosulfonila 0,1 mM). As amostras foram fervidas por 6 minutos e centrifugadas a 8000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Oitenta µg de proteína (quantificada pelo método de Lowry et al., 1951) do sobrenadante foi misturado com glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 8% e SDS 10 %. Essas amostras foram então colocadas em gel de acrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. As proteínas da membrana foram coradas com solução de Ponceau (0,5% Ponceau em 5% ácido acético em água) e a intensidade da coloração de cada banda utilizada como controle de proteínas (ROMERO-CALVO et al., 2010). Após descoradas, as membrans

foram bloqueadas com albumina sérica bovina 1% e incubadas com os anticorpos anti-TH (1:1000; Millipore; AB152) ou anti-DAT (1:1000; Millipore; AB2231) ou anti-Bcl-2 (1:1000; Millipore; AB18210) seguidos de anticorpo secundário acoplado a fosfatase alcalina (1:3000; Millipore) em sistema SNAP ID®. A reação foi determinada por ensaio colorimétrico com tetrazolium nitroazul com fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) como substrato (TREVISAN et al., 2013). Para a quantificação das bandas, as membranas foram escaneadas e a coloração das bandas quantificada pelo software ImageJ. A coloração das bandas foi comparada com a coloração da banda quando corada por Ponsoeu e expressa como densidade óptica reativa (reactive optical density - ROD). Cada experimento foi repetido 4 vezes.

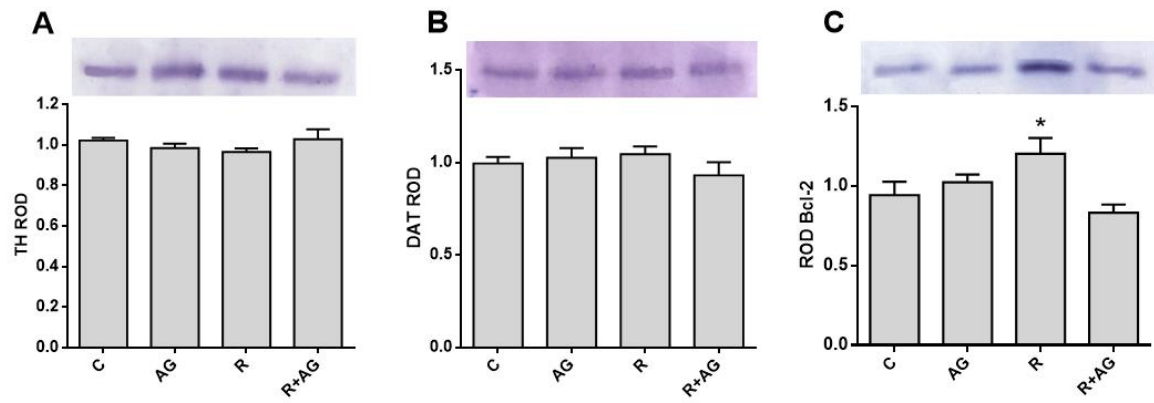
### Análise estatística

Os valores de IC50 da atividade da MAO (total, A e B) foram calculados através da equação da reta de cada curva. Os resultados do Western-blot foram analisados por análise de variância de duas vias ANOVA seguida de teste de *pos-hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  e expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

### Resultados



**Figura 1.** Efeito do AG na atividade da monoaminoxidase (MAO) total (MAO-T), isoforma A (MAO-A) e isoforma B (MAO-B). MAO-T IC50 = 281,71  $\pm$  2,27  $\mu$ g de AG/mL; MAO-A IC50 = 279,62  $\pm$  3,64  $\mu$ g de AG/mL; MAO-B IC50 = 278,21  $\pm$  5,35  $\mu$ g de AG/mL.



**Figura 2.** Imunoreatividade das proteínas TH (A), DAT (B) e Bcl-2 (C) em estriado de ratos tratados com reserpina (1mg/kg/dia, sc) durante 3 dias, seguido por tratamento com AG (13,5 mg/kg/dia, vo) por 3 dias. # mostra diferença do grupo reserpina (R) + AG.



## 4 DISCUSSÃO

Na presente tese, os efeitos da reserpina sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais foram avaliados em dois modelos animais, sendo um vertebrado (rato) e outro invertebrado (verme). Isso vem de acordo com a emergente necessidade de se refinar, reduzir e substituir o uso de animais vertebrados nas pesquisas científicas. Observou-se que ambos modelos animais se complementaram para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais induzidas por reserpina, principalmente no que diz respeito a alterações oxidativas e em proteínas do sistema dopaminérgico.

Inicialmente, experimentos com ratos foram realizados para a avaliação da discinesia orofacial induzida por reserpina, a qual está bem descrita na literatura (ABÍLIO et al., 2004; BARCELOS et al., 2011; BURGER et al., 2003; BUSANELLO et al., 2011; DUTRA et al., 2002; FARIA et al., 2005; FERNANDES et al., 2012; NEISEWANDER et al., 1994; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2008, 2009; TREVIZOL et al., 2011). Em acordo, o tratamento com reserpina (1 mg/kg/dia, sc, por 3 dias) aumentou a frequência de MMVs nos ratos em relação aos animais controle (dia 4). Em adição, esse aumento na frequência de MMVs se manteve por 3 dias após o término do tratamento com reserpina (dia 7) (Figura 2 do artigo 1), sugerindo manutenção permanente. Seria interessante ter realizado novas avaliações comportamentais após maior tempo (semanas) do término do tratamento com reserpina, uma vez que os dados da literatura ainda são conflitantes sobre a irreversibilidade ou não da discinesia orofacial induzida por reserpina, que parece depender do tratamento adotado. Como exemplo, Neisewander et al. (1994) sugerem que o tratamento crônico com baixas doses de reserpina (0,01, 0,05, 0,1, ou 1,0 mg/kg, sc, dia sim dia não, por 100 dias) causa discinesia orofacial persistente após o término da exposição. Por outro lado, outros trabalhos demonstram que a administração aguda de reserpina (geralmente 5 mg/kg, sc, em administração única) induz parkinsonismo farmacológico temporário (DUTY & JENNER, 2011; HEERINGA & ABERCROMBIE, 1995; STEINPREIS & SALAMONE 1993).

Em humanos, a discinesia tardia e a DP manifestam-se na maior parte dos casos de forma irreversível (CASEY, 1985; CRANE, 1973; GLAZER et al., 1990; JESTE et al., 1979; LEES et al., 2009). Além disso, outro fator que reduz a qualidade de vida da população acometida por essas doenças é que, até o presente momento, nenhuma terapia é capaz de reverter os movimentos involuntários já instalados (ANDREASSEN et al., 2003; LOHR et al., 2003). Em função desses fatores, estudos na área são necessários, principalmente visando a

descoberta de compostos que possam impedir o avanço ou até mesmo reverter os movimentos involuntários presentes nessas doenças. No presente trabalho, o AG foi testado no modelo de MMVs induzidos por reserpina em ratos. Como resultado, o AG (4,5 , 13,5 ou 40,5 mg AG/kg/dia, vo, do dia experimental 4 ao 7) reduziu o aumento na frequência dos MMVs induzido por reserpina (Figura 2 do artigo 1), demonstrando efeito protetor. Em acordo, o AG já apresentou atividade neuroprotetora frente a outros modelos experimentais, como de toxicidade induzida por 6-OHDA (MANSOURI et al., 2005) ou chumbo em ratos (RECKZIEGEL et al., 2011), assim como peptídeo beta amilóide em células neurais (BASTIANETTO et al., 2006), principalmente devido a suas propriedades antioxidantes e antiapoptóticas. Entretanto, permanecem incertos os mecanismos de proteção do AG na discinesia orofacial induzida por reserpina em ratos. Dentre as vantagens do uso do AG estão suas propriedades, já descritas, e que ele é encontrado em diversas fontes naturais e de baixo custo (CHU et al., 2002; WOLFE et al., 2003). Além disso, sua toxicidade é extremamente baixa – a dose letal para 50% dos animais experimentais é 5 g AG/kg em ratos (SHAHRZAD et al., 2001), conferindo segurança no uso.

Análises bioquímicas foram realizadas em estriado e córtex cerebral dos ratos tratados com reserpina e/ou AG. O estriado é uma região cerebral rica em DA e particularmente relacionada ao desenvolvimento de movimentos involuntários (principalmente região do neostriado ventrolateral) uma vez que participa do controle motor (KELLEY et al., 1989; SALAMONE et al., 1998). Por outro lado, o córtex é pouco envolvido no controle dos movimentos e tem baixos níveis de DA, logo foi utilizado como controle negativo. Contudo, no presente trabalho, a reserpina não alterou os parâmetros de peroxidação lipídica e de geração de EROs (TBARS e oxidação da DCFH-DA, respectivamente) e de antioxidantes (GSH e tiol protéico) nessas regiões cerebrais de ratos. Além disso, não houve efeito do AG *per se* ou quando associado a reserpina (Tabela 1 do artigo 1), demonstrando que o estresse oxidativo provavelmente não está relacionado aos eventos comportamentais observados em ratos.

Contrário a esses resultados, outros trabalhos da literatura demonstraram alteração em parâmetros de estresse oxidativo no estriado de roedores com MMVs induzidos por reserpina (ABÍLIO et al., 2003; BILSKA et al., 2007; BURGER et al., 2003; FARIA et al., 2005; FERNANDES et al., 2012; NAIDU et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2008, 2009) e redução das defesas antioxidantes, como da concentração de GSH (ABÍLIO et al., 2003; ALUF et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2008). Esses trabalhos sugerem que a inibição do TVMs exercida pela reserpina impede o armazenamento de DA em vesículas; logo, aumenta o metabolismo desta

monoamina pela MAO, a que leva à geração de EROs como subprodutos do seu funcionamento (MARCHITTI et al., 2007). Nesse contexto, seria interessante ter quantificado os níveis de DA e DOPAC e a atividade da MAO no estriado dos ratos tratados com reserpina, como parâmetros para avaliar o metabolismo da DA nos ratos do presente estudo. Também, sabe-se que a DA em excesso pode se auto-oxidar gerando quinonas altamente reativas (ALUF et al. 2011), as quais contribuem para um quadro de estresse oxidativo. Logo, observa-se que a relação entre EROs e MMVs não está esclarecida e que possivelmente o estresse oxidativo não é responsável pela fisiopatologia da discinesia orofacial induzida por reserpina, tornando importante a investigação de outros mecanismos.

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um transportador importante na regulação do potencial de membrana das células excitáveis (GEERING, 1997; PAVLOV & SOKOLOU, 2000), participando assim da sinalização celular, da atividade neural e de todo o comportamento animal (JAMME et al., 1995; LEES et al., 1990; LI & STYS, 2001). Em 2011, Pereira et al. (2011) demonstraram que a atividade desse transportador na *substantia nigra* está negativamente relacionada com a frequência de MMVs induzidos por reserpina em ratos. Entretanto, quando a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi avaliada em estriado ou córtex de ratos tratados com reserpina e/ou AG, nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada na sua forma total e na isoforma alfa (Tabela 2 do artigo 1). Esses resultados sugerem que também a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no estriado não está relacionada aos MMVs induzidos por reserpina em ratos.

Devido à relação entre as doenças que apresentam movimentos involuntários com neurodegeneração dopaminérgica – como de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra* em pacientes com DP – o estudo apresentado no artigo 2 avaliou, dentre outros parâmetros, a capacidade da reserpina em induzir neurodegeneração. Para isso, *C. elegans* foram utilizados devido às diversas vantagens oferecidas por esse invertebrado em estudos de neurodegeneração. Por exemplo, os *C. elegans* são transparentes, possuem genoma simples e um sistema nervoso bem descrito (ver McDONALD et al., 2007). Além disso, a inserção de proteínas fluorescentes (como GFP) a genes específicos de proteínas dopaminérgicas (como do DAT, gene *dat-1*) permite a visualização da morfologia dos neurônios no verme vivo (NASS et al., 2002; NASS & SETTIVARI, 2008).

A exposição dos vermes a reserpina ocorreu em placas contendo meio de crescimento de nematóide, *E. coli* OP50 e 30 ou 60  $\mu\text{M}$  de reserpina, conforme já descrito na literatura (ARYA et al., 2009; SAHARIA et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2008). A duração da exposição variou de 3 a 8 dias. Optou-se por iniciar a exposição a reserpina com vermes em

estágio larval L1 devido a maior facilidade em se observar alterações neurodegenerativas quando os vermes estão com seus neurônios em formação, do que em animais adultos (dados não publicados dos laboratórios do professor Dr. Michael Aschner e Dr. Félix Soares). Além disso, trabalho prévio mostrou que ocorre aumento na expectativa de vida dos vermes independente se a exposição a reserpina se inicia com vermes em estágio larval L1 ou adultos (SRIVASTAVA et al., 2008).

Quanto aos parâmetros avaliados, inicialmente uma triagem dos efeitos da reserpina foi realizada em *C. elegans*. Observou-se que a reserpina dose e tempo dependente reduziu a sobrevivência dos vermes N2 e BY200 (Figura 1 do artigo 2). Os trabalhos até então haviam avaliado apenas o tempo de vida de vermes expostos a reserpina, mostrando que a reserpina aumenta a expectativa de vida deles (ARYA et al., 2009; SAHARIA et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2008; TAUFFENBERGER et al., 2013) por mecanismos que parecem não envolver vias que controlam o envelhecimento e o estresse, como a via da *daf-16* da insulina (SRIVASTAVA et al., 2008; TAUFFENBERGER et al., 2013). Em adição, também foi observado que a reserpina causou um atraso no desenvolvimento dos vermes (Figura 2 do artigo 2), alterou a ingestão de alimentos, a defecação e a postura de ovos (Tabela 1 do artigo 2). Essas análises foram realizadas também por Srivastava et al. (2008) em vermes expostos a 30  $\mu$ M de reserpina. Como resultado, Srivastava et al. (2008) observou atraso no desenvolvimento, redução do número de ovos nos vermes e prolongado período em que os vermes apresentam normal frequência de batimentos faríngeos antes da redução desse parâmetro devido a envelhecimento.

Sabe-se que redução na ingestão de alimentos (avaliada no presente trabalho pela frequência dos batimentos faríngeos) pode influenciar negativamente ou não a sobrevivência dos vermes (PAPAIOANNOU et al., 2005). Entretanto, esses parâmetros não podem ser correlacionados diretamente uma vez que a redução nos batimentos faríngeos também está relacionada a aumento no tempo de vida desses animais (HUANG & KORNFELD, 2004). Por exemplo, redução na frequência dos batimentos faríngeos e aumento do tempo de vida está bem descrito na exposição de vermes a beta-caroteno (PANT et al., 2014) ou curcumina (LIAU et al., 2011). Além disso, a ativação de vários genes, como o gene de restrição calórica *eat-2*, aumenta a expectativa de vida dos vermes (LAKOWSKI & HEKIMI, 1998). Logo, a redução da sobrevivência dos vermes expostos a reserpina não está necessariamente relacionada a redução na frequência dos batimentos faríngeos, até porque parece que os animais expostos a reserpina não estavam com privação de alimento. De acordo com Sawin et al. (2000), vermes

com restrição de alimentos apresentam menor atividade locomotora na comida em relação aos controles, e no presente estudo a atividade locomotora dos vermes expostos a reserpina foi maior do que os controles (Figura 2 do artigo 2). Isto demonstra que os vermes expostos a reserpina apresentaram redução na frequência dos batimentos faríngeos mas estavam se alimentando.

Como próxima etapa, a atividade locomotora de *C. elegans* expostos a reserpina foi avaliada, e os níveis de DA quantificados. A resposta basal lenta é um comportamento dependente principalmente de DA. Nele, vermes reduzem sua atividade locomotora quando estão em ambiente com alimento para facilitar a alimentação (SAWIN et al., 2000). Vermes *cat-2*, deficientes de tirosina hidroxilase, enzima limitante na síntese de DA, não apresentam essa redução na atividade locomotora (SAWIN et al., 2000), conforme observado no presente estudo (Figura 3 do artigo 2). Semelhante aos vermes *cat-2*, os vermes tratados com reserpina também não apresentaram resposta basal lenta, conforme relatado por Duerr et al. (1999), indicando alteração nos níveis de DA. Baixos níveis de DA em vermes expostos a reserpina foram confirmados pela quantificação dos níveis dessa monoamina (Figura 4 do artigo 2), condizendo com os resultados previamente observados em ratos tratados com reserpina (DUTY & JENNER, 2011). Como dado complementar, seria interessante ter quantificado também os níveis de HVA nos vermes expostos a reserpina, de forma a avaliar a metabolização da DA nos vermes.

A avaliação da morfologia de neurônios dopaminérgicos cefálicos (CEP) de vermes BY200, com GFP acoplado ao gene *dat-1*, expostos a reserpina revelou: 1) redução na fluorescência dos neurônios (Figura 5 do artigo 2); 2) diminuição no número de neurônios intactos por verme; e 3) aumento do número de somas atrofiados por verme (Figura 6 do artigo 2). Essas alterações indicam que a reserpina causa neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos. Esses resultados poderiam ser um falso positivo caso a expressão dos genes responsáveis pela fluorescência dos vermes BY200 estivesse reduzida, mas, pelo contrário, a reserpina aumentou a expressão dos gene *dat-1* e do GFP (Figura 7 do artigo 2). Curiosamente, dias após a retirada da exposição à reserpina, os vermes apresentaram morfologia de seus neurônios dopaminérgicos CEP similar a dos animais controle, assim como expressão normal de *dat-1* e GFP (Figura 6 e 7 do artigo 2), sugerindo que os eventos observados são dependentes da exposição à reserpina e reversíveis. Esse achado é novo na literatura e coloca em dúvida se os achados de neurodegeneração de outros trabalhos utilizando *C. elegans* também seriam reversíveis. Além das alterações morfológicas, após o término da exposição a reserpina, os

vermes também recuperaram o comportamento de resposta basal lenta (Figura 3 do artigo 2). Na verdade, mais estudos são necessários para se compreender melhor o porquê em ratos o tratamento por 3 dias com reserpina causou danos comportamentais aparentemente permanentes (artigo 1), e em *C. elegans* o tratamento crônico causou danos comportamentais e na morfologia dos neurônios dopaminérgicos reversíveis após o término da exposição à reserpina. É possível que o *C. elegans* apresente capacidade neurogênica maior do que humanos e roedores.

Para compreender melhor os efeitos da reserpina sobre o sistema dopaminérgico, vermes deficientes em proteínas desse sistema foram expostos a reserpina e a sobrevivência deles foi avaliada durante 4 dias. Como resultado, a reserpina reduziu a sobrevivência de animais deficientes do gene do TVMs (*cat-1*), o que condiz com a reconhecida ação da reserpina em bloquear esse transportador e depletar monoaminas (RUDNICK et al., 1990). Além disso, a reserpina reduziu a sobrevivência de vermes deficientes do gene do DAT (*dat-1*), mostrando que esse transportador também está envolvido no mecanismo de ação da reserpina, dado novo na literatura. Por outro lado, a sobrevivência de vermes deficientes do gene da TH (*cat-2*) e dos receptores de DA (*dop-1*, *dop-2*, *dop-3* e *dop-4*) não foi alterada em relação aos vermes selvagens N2 (Figura 8 do artigo 2).

O DAT é responsável por remover a maior parte da DA da fenda sináptica, de forma a encerrar a neurotransmissão dopaminérgica, transportando a DA para dentro do terminal pré-sináptico (CASS et al., 1993; KILTY et al., 1991; SHIMADA et al., 1991). Sabe-se que a inibição ou redução da atividade do DAT é responsável por um aumento nos níveis extracelulares de DA, os quais podem ser neurotóxicos (HUOTARI et al., 2002; McDONALD et al., 2007). Na verdade, trabalhos demonstram que pacientes com DP apresentam redução de 50–70% dos níveis de DAT (SEEMAN & NIZNIK, 1990). Logo, a redução da sobrevivência de vermes deficientes em *dat-1* expostos a reserpina sugere ação da reserpina no DAT e acúmulo de DA no espaço extracelular. Nesse contexto, o aumento da expressão do *dat-1* em vermes BY200 expostos a reserpina poderia ser um mecanismo compensatório para remover o excesso de DA na fenda sináptica – ou ainda porquê o DAT que está sendo produzido não está sendo ancorado normalmente a membrana celular dos neurônios dopaminérgicos.

Para avaliar a participação da DA exógena na toxicidade induzida por reserpina, *C. elegans* foram expostos a concentrações sub-letais de DA antes da exposição à reserpina, e a sobrevivência avaliada. A concentração de DA utilizada foi extremamente alta devido a dificuldade de atravessar a cutícula do verme, a qual é super resistente (SAWIN et al., 2000).

Como resultado, a DA exógena aumentou a sensibilidade dos vermes a reserpina, visto que estes tiveram menor sobrevivência em relação aos vermes controle também pré-expostos a DA (Figura 9 do artigo 2). Logo, a DA exógena exerce papel importante na toxicidade induzida por reserpina. Para a confirmação desses achados, seria necessária a quantificação dos níveis de DA considerando a concentração presente dentro dos neurônios e no espaço extracelular separadamente, mas isso fica como sugestão para estudos futuros. Nesse contexto, acredita-se que um acúmulo de DA extracelular em verme expostos a reserpina possa ser devido a alguma interferência no funcionamento do DAT. Como forma de proteção de possível toxicidade dopaminérgica, a reserpina ativou a via de detoxificação SKN-1 (homóloga da via Nrf-2 de humanos) por ativar GSTs (Figura 10 do artigo 2).

Devido aos resultados em *C. elegans*, a imunoreatividade ao DAT foi avaliada em estriado de ratos tratados com reserpina e/ou AG, entretanto nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos experimentais (Figura 1 dos dados complementares). Também, a imunoreatividade a TH não se mostrou alterada em estriado de ratos tratados com reserpina e/ou AG (Figura 1 dos dados complementares). Com certeza existam diferenças entre esses dois modelos animais. Ainda, é possível que 1) as alterações no DAT exercidas pela reserpina em ratos sejam dependentes da exposição a reserpina, logo, quando os ratos ficam 3 dias na ausência de reserpina a imunoreatividade ao DAT volta ao normal apesar da manutenção dos MMVs (figura 2 do artigo 1). Outras possibilidades são que 2) o tempo de duração do tratamento realizado não foi suficiente para causar alterações significantes no DAT, nem na TH, em ratos e/ou 3) o DAT pode estar apresentando alterações em sua atividade apesar da manutenção normal dos níveis de proteínas imuoreativas ao DAT em estriado.

Buscando entender melhor o efeito protetor do AG nos MMVs induzidos por reserpina (Figura 2 do artigo 1), o efeito do AG na atividade da MAO foi investigado *in vitro* em cérebro total de ratos. Várias doenças neurológicas, incluindo a DP, têm sido associadas a estresse oxidativo e aumento da atividade da MAO-B no SNC (GOOD et al., 1996; VOLZ & GLEITER, 1998). Também diversos trabalhos relatam que inibidores da MAO (como seleginina, rasagilina, tolcapone e amantadina) podem exercer efeitos benéficos em modelos de neurotoxicidade por evitarem a geração de EROs provenientes do metabolismo de monoaminas pela MAO (DUTY & JENNER, 2011; YODIM & BAKHLE, 2006; YUDIM et al., 2006). Entretanto, o AG mostrou fraca capacidade de inibir essa enzima (total e isoformas A e B) (Figura 1 dos dados complementares) devido aos elevados valores de IC50 observados. Quanto a capacidade antiapoptótica, o AG *per se* ou associado à reserpina não aumentou a imunoreatividade a Bcl-

2 em estriado de ratos (Figura 2 dos dados complementares). Logo, o efeito do AG na discinesia orofacial induzida por reserpina em ratos parece não envolver diretamente sua ação antioxidante, nem antiapoptótica ou inibição da MAO. Mais estudos devem ser realizados para se entender melhor o efeito neuroprotetor do AG no modelo da reserpina.

Os resultados do presente estudo não permitem um posicionamento maduro sobre se o modelo de MMVs induzido por reserpina é um modelo de estudo da DP ou da discinesia tardia. Na verdade, a reserpina parece ser um modelo de estudos de movimentos involuntários. Observou-se depleção dos níveis de DA em *C. elegans* expostos a reserpina, assim como neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos, o que condiz com características da DP (). Por outro lado, os MMVs observados em ratos, foram na região orofacial, principal local onde se manifestam os movimentos involuntários em pacientes com discinesia tardia (). Acredita-se que a partir de trabalhos como este, investigando os mecanismos envolvidos nos movimentos involuntários induzidos por reserpina, possa-se entender melhor sobre esse modelo animal, bem como da fisiopatologia dos movimentos involuntários o que facilitaria também a busca por tratamentos eficientes.



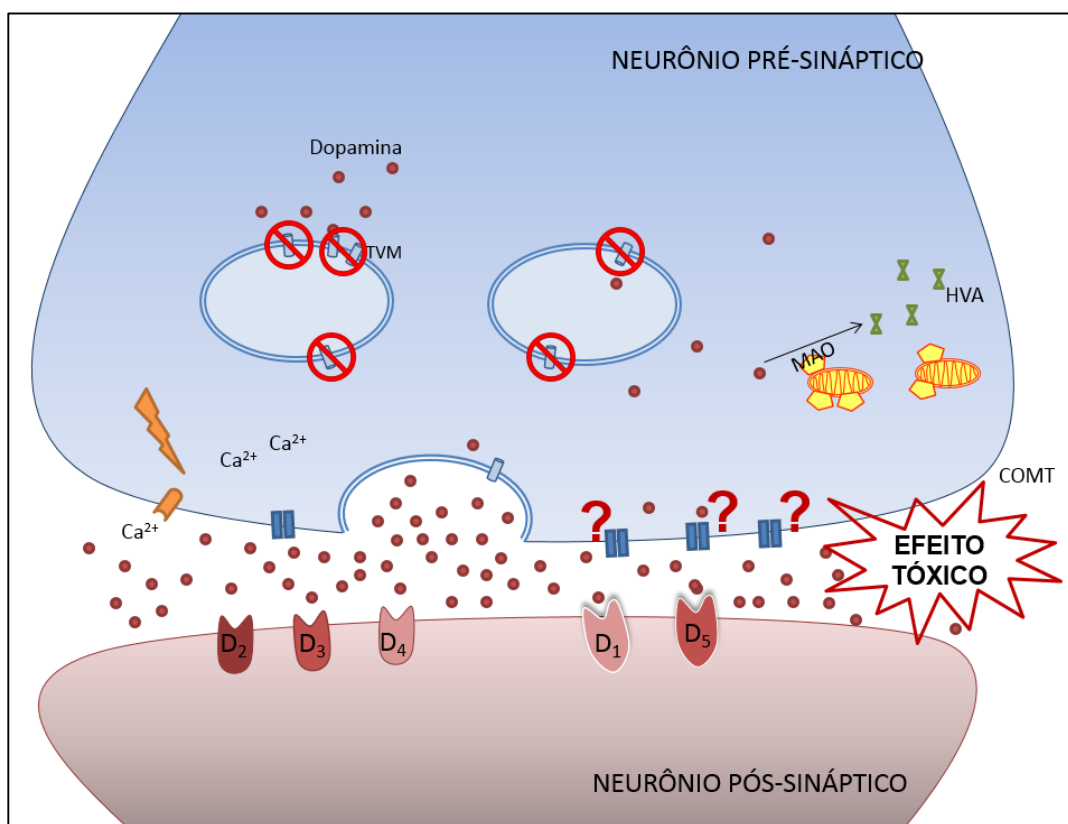
## 5 CONCLUSÕES

### Conclusões específicas

- Ratos tratados com reserpina desenvolveram discinesia orofacial, a qual foi amenizada pelo tratamento com o antioxidante AG;
- O estresse oxidativo parece não estar envolvido diretamente na discinesia orofacial induzida por reserpina em ratos;
- O AG *per se* não alterou parâmetros de estresse oxidativo e de antioxidantes em estriado e córtex cerebral;
- A atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (total e subunidade alfa) não foi alterada pelo tratamento com reserpina e/ou AG em estriado e córtex de ratos;
- O tratamento com reserpina e AG *per se* não alterou a imunoreatividade das proteínas DAT, TH e Bcl-2 em estriado de ratos;
- O efeito do AG na discinesia orofacial induzida por reserpina em ratos não envolve seu efeito antioxidante, nem antiapoptótico ou inibição da MAO;
- *C. elegans* expostos a reserpina apresentaram redução na sobrevivência, desenvolvimento, ingestão de alimentos, produção e postura de ovos e do tempo entre as defecações;
- O tratamento com reserpina aumentou a atividade locomotora dos vermes quando na presença de comida e reduziu a concentração de DA;
- A exposição à reserpina causou neurodegeneração dopaminérgica em *C. elegans*, e esse efeito foi revertido após o término da exposição dos vermes a esse depletor de monoaminas;
- A reserpina parece agir no TVMs e no DAT em *C. elegans*, baseado na redução da sobrevivência dos vermes nocautes deficientes em TVMs (animais cat-1) e DAT (animais dat-1), respectivamente;
- Um provável excesso de DA extracelular agrava a toxicidade induzida por reserpina em *C. elegans*;
- A reserpina ativa a via SKN-1 em vermes.

## Conclusão geral

A discinesia orofacial induzida por reserpina envolve a depleção de monoaminas via bloqueio do TVMs, assim como neurotoxicidade resultante de um excesso de DA extracelular causada por interferência no funcionamento do DAT. A neurodegeneração dopaminérgica em *C. elegans* é reversível após o término da exposição à reserpina. Além disso, o AG pode ter uso promissor no tratamento de doenças com movimentos involuntários. Mais estudos avaliando a ação da reserpina no DAT e os mecanismos de proteção do AG são necessários.



**Figura 5.** Efeitos da reserpina no sistema dopaminérgico de *C. elegans*.

## 6 REFERÊNCIAS

ABÍLIO, V. C., et al. Effects of melatonin on orofacial movements in rats. **Psychopharmacology**, v. 161, p. 340-347, 2002.

ABÍLIO, V. C., et al. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal GSSG/GSH ratio enhancement in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 109-14, 2003.

ABÍLIO, V. C., et al. Important role of striatal catalase in aging and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 263-72, 2004.

ABU-AMSHA, C. R., et al. Red wine polyphenols in the absence of alcohol reduce lipid peroxidation in smoking subjects. **Free Radical Bio. Med.**, v. 30, p. 636-642, 2001.

ALKEMA, M. J., et al. Tyramine functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. **Neuron**, v. 46, p. 247-260, 2005.

ALUF, Y., et al. Alterations in striatal oxidative stress level produced by pharmacological manipulation of dopamine as shown by a novel synthetic marker molecule. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 87-94, 2011.

ALVES, G., et al. Epidemiology of Parkinson's disease. **J. Neurol.**, v. 255(Suppl 5), p. 18-32, 2008.

AMARA, S. G.; KUHAR, M. R. Neurotransmitter transporters: recent progress. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 73-93, 1993.

ANDJELKOVICA, M. C., et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chem.**, v. 98, p. 23-31, 2006.

ANDREASSEN, O. A.; JORGENSEN, H. A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? **Prog. Neurobiol.**, v. 61, p. 525-541, 2000.

ANDREASSEN, O. A., et al. Oral dyskinesia and histopathological alterations in substantia nigra after long term haloperidol treatment of old rats. **Neuroscience**, v. 122, p. 717-725, 2003.

ANTONELLI, M. C., et al. New strategies in Neuroprotection and Neurorepair. **Neurotox. Res.**, v. 21, p. 49-56, 2012.

ARYA U., et al. Reserpine ameliorates A $\beta$  toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans*. **Exp. Geront.**, v. 44, p. 462-466, 2009.

ARORA, V., et al. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: Behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, p. 1570-1581, 2011.

BARCELOS, R. C. S., et al. Effects of  $\omega$ -3 Essential Fatty Acids ( $\omega$ -3 EFAs) on Motor Disorders and Memory Dysfunction Typical Neuroleptic-induced: Behavioral and Biochemical Parameter. **Neurotox. Res.**, v. 17, p. 228-237, 2010.

BARCELOS, R. C., et al. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. **Lipids**, v. 46, p. 143-149, 2011.

BARGMANN, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. **Science**, v. 282, p. 2028-2033, 1998.

BASKIN, P.; SALAMONE, J. Vacuous jaw movements in rats induced by acute reserpine administration: interactions with different doses of apomorphine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 46, p. 793-797, 1993.

BASTIANETTO, S., et al. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against  $\beta$ -amyloid induced toxicity. **Eur. J. Neurosci.**, v. 23, p. 55-64, 2006.

BAUMEISTER, A. A., et al. The monoamine hypothesis of depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. **J. Hist. Neurosci.**, v. 12(2), p. 207-220, 2003.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative disease. **Ann. Neurol.**, v. 38, p. 357-366, 1995.

BENEDETTI, A., et al. Effects of carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids on various microsomal enzyme activities of the liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 620, p. 281-296, 1980.

BENEDETTO, A., et al. Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in aBLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet.**, v. 6, p. e1001084, 2010.

BERGAMO, M., et al. Effects of age on a new animal model of tardive dyskinesia, **Neurobiol. Aging**, v. 18, p. 623-629, 1997.

BERLINER, J. A.; WATSON, A. D. N. A role for oxidized phospholipids in Atherosclerosis. **Engl. J. Med.**, v. 353, p. 9-11, 2005.

BIGELOW, B. **Encyclopedia of Drugs and Addictive Substances**. Thomson Gale, Farmington Hills, MI, USA, 2006.

BILSKA, A. et al. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpina-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. **Neuroscience**, v. 146, p. 1758-1771, 2007.

BISHNOI, M. et al. Activation of striatal inflammatory mediators and caspase-3 is central to haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 590, p. 241-245, 2008.

BOVE, J., et al. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx**, v. 2, p. 484-494, 2005.

BOVERIS, A., et al. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem. J.**, v. 128, p. 617-630, 1972.

BRANDT, R., et al. A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau. **Neurobiol. Aging**, v. 30, p. 22-33, 2009.

BRAUNGART, E., et al. *Caenorhabditis elegans* MPP<sup>+</sup> model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings, **Neurodegener. Dis.**, v. 1, p. 175-183, 2004.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71-94, 1974.

BUIJS, R. M., et al. The dopaminergic innervations of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopical study. **Brain Research**, v. 323, p. 65-72, 1984.

BURGER, M. E., et al. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v. 27, p. 135-140, 2003.

BURKE, K.; WEI, H. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. **Toxicol. Ind. Health**, v. 25, p. 219-224, 2009.

BURT, D., et al. Antischizophrenic drugs: Chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. **Science**, v. 196, p. 326-327, 1977.

BUSANELLO, A. et al. Resveratrol protects against a model of vacuuous chewing movements induced by reserpine in mice. **Behav. Pharmacol.**, v. 22, p. 71-75, 2011.

BUSANELLO, A., et al. Resveratrol reduces vacuuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 101, p. 307-310, 2012.

BYERLY, Y. L., et al. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. **Dev. Biol.**, v. 51, p. 23-33, 1976.

CALDWELL, G. A., et al. Suppression of polyglutamine-induced protein aggregation in *Caenorhabditis elegans* by torsin proteins. **Hum. Mol. Genet.**, v. 12, p. 307-319, 2003.

CALVENTE, P. R. V., et al. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid aggravates reserpine induced oral dyskinesia in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v. 26, p. 1-5, 2002.

CAO, S., et al. Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 3801-3812, 2005.

CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 1, p. 393-400, 1975.

CARLSSON, A., et al. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, p. 1200, 1957.

CASEY, D. E. Tardive dyskinesia: reversible and irreversible. **Psychopharmacology**, v. 2, p. 88-97, 1985.

CASS, W. A., et al. Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 2269-2278, 1993.

CHALFIE, M., et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHASE, D. L., et al. Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. **Nat. Neurosci.**, v. 7, p. 1096-1103, 2004.

CHEN, B. L., et al. Wiring optimization can relate neuronal structure and function, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p. 4723-4728, 2006.

CHIA, Y. C., et al. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. **Molecules**, v. 15, p. 8377-8389, 2010.

CHU, Y. P., et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6910-6916, 2002.

CLARKE, D. D.; SOKOLOFF, L. Circulation and energy metabolism of the brain. In **Basic neurochemistry: molecular, cellular and Medical aspects**. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA, p. 637-669, 1999.

COLBERT, H. A., BARGMANN, C. I. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C.elegans*. **Neuron**, v, 14, p. 803-812, 1995.

COLPAERT, F. C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rats. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 1431-1440, 1987.

COOPER, J. R., et al. **The biochemical basis of Neuropharmacology**. Oxford Univ. Press Inc., New York, 2003.

COOPER, P. R., et al. 20-HETE Mediates Ozone-Induced, Neutrophil-Independent Airway Hyper-Responsiveness in Mice. **PLoS One**, v. 5(4), p. e10235, 2010.

COULSON, A., et al. YACs and *C. elegans* genome. **Bioessays**, v. 13, p. 413-417, 1991.

CRANE, G. E. Persistent dyskinesia. **Br. J. Psychiatry**, v. 122, p. 395-405, 1973.



DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system, I: Demonstration of monoamines in the cell bodies of the brain stem neurons. **Acta Physiol Scand.**, v. 62, p. 1-55, 1964.

DANI, J. A.; ZHOU, F. M. Selective dopamine filter of glutamate striatal afferents. **Neuron**, v. 42, p. 522-524, 2004.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAVIES, K. J. A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. **Life**, v. 50, p. 279-289, 2000.

DAWSON, L., et al. The group II metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, alleviates akinesia following intranigral or intraventricular administration in the reserpine-treated rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 541-546, 2000.

DOLPHIN, A., et al. Modification of the L-DOPA reversal of reserpine akinesia by inhibitors of dopamine-beta-hydroxylase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 35(1), p. 135-144, 1976.

DUERR, J. S., et al. The *cat-1* gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 72-84, 1999.

DUTRA, R. C., et al. Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 26, p. 487-495, 2002.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br. J. Pharmacol.**, v. 164(4), p. 1357-1391, 2011.

ELLENBROEK, B. A. Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 57, p. 1-78, 1993.

ELVERFORS, A.; NISSBRANDT, H. Reserpine-insensitive dopamine release in the substantia nigra? **Brain Research**, v. 557, p. 5-12, 1991.

ESTERBAUER, H., et al. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biol. Med.**, v. 11, p. 81-128, 1991.

FACHINETTO, R., et al. *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 31, p. 1478-1486, 2007a.

FACHINETTO, R., et al. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 194, p. 423-432, 2007b.

FANN, W. E.; LAKE, R. L. On the coexistence of parkinsonism and tardive dyskinesia. **Dis. Nerv. Sys.**, v. 35, p. 324-326, 1974.

FARIA, R. R., et al. Beneficial effect of vitamin C and vitamin E on reserpina-induced oral dyskinesia in rats: Critical role of striatal catalase activity. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 993-1001, 2005.

FERNANDES, V. S., et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behav. Brain Res.**, v. 231, p. 154-163, 2012.

FERREIRA, D. W., et al. Using the alternative model *C. elegans* in reproductive and developmental toxicology studies. **Methods in Pharmacology and Toxicology**. New York: Springer Science Business Media New York, 2014. DOI 10.1007/7653\_2014\_27.

FERRO, M. M., et al. Comparison of bilaterally 6OHDA and MPTP lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J. Neurosc. Methods**, v. 148, p. 78-87, 2005.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 222, p. 236-245, 1999.

FOYE, W. O. Medicinals of plant origin: historical aspects. In: FOYE, W. O.; LAMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. (Eds.), **Medicinal Chemistry**, 1<sup>st</sup> ed. B. I. Waverly Pvt. Ltda, New Delhi, p. 7-11, 1995.

GAINETDINOV, R. R., et al. Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. **Brain Research Reviews**, v. 26, p. 148-153, 1998.

GAINETDINOV, R. R., et al. Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 367-373, 2002.

GALI, H. U., et al. Inhibition of Tumor Promoter-induced Ornithine Decarboxylase Activity by Tannic Acid and Other Polyphenols in Mouse Epidermis in Vivo. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2820-2825, 1991.

GEERING, K. Na, K-ATPase. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 6, p. 434–439, 1997.

GICHNER, T. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. **Folia Microbiol.**, v. 32, p. 55-62, 1987.

GIROS, B.; CARON, M. Molecular characterization of the dopamine transporter. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, p. 43-49, 1993.

GIROS, B., et al. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, v. 379, p. 606-612, 1996.

GIROTTI, A. W.; KRISKA, T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. **Antioxid. Redox Signaling**, v. 6, p. 301-310, 2004.

GLAZER, W. M., et al. Predictors of improvement in tardive dyskinesia following discontinuation of neuroleptic medication. **Br. J. Psychiatry**, v. 157, p. 585-592, 1990.

GOOD, P. F., et al. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. **Am. J. Pathol.**, v. 149, p. 21-28, 1996.

GORDON, I., et al. Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. **European J. Pharmacol.**, v. 298, p. 27-30, 1996.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2 edição. Atheneu. São Paulo, 2012.

GRIENGLING, K. K.; USHIO-FUKAI, M. Reactive Oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. **Regulatory Peptides**, v. 91, p. 21-27, 2000.

GUNNE, L. M.; ANDRÉN, P. E. An animal model for coexisting tardive dyskinesia and tardive parkinsonism: a glutamate hypothesis for tardive dyskinesia. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 1, p. 90-95, 1993.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovasc. Res.**, v. 47, p. 410-418, 2000.

HALLIDAY, J., et al. Nithsdale Schizophrenia Survey 23: movement disorders: 20 –year review. **Br. J. Psychiatry**, v. 181, p. 422-427, 2002.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochem. Sci.**, v. 31, p. 509-515, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **Biomed. J.**, v. 37, p. 99-105, 2014.

HAMAMICHI, S., et al. Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, p. 728-733, 2008.

HARRINGTON, A. J., et al. Functional analysis of VPS41-mediated neuroprotection in *Caenorhabditis elegans* and mammalian models of Parkinson's disease. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 2142-2153, 2012.

HARRISON, B., et al. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **Neurotoxicology**, v. 34, p. 74-81, 2013.

HASHIMOTO, K. et al. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in the striatum of monkeys treated with methamphetamine. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 2018-2023. 2004.

HAYATSU, H., et al. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 202, p. 429-446, 1988.

HEERINGA, M. J.; ABERCROMBIE, E. D. Biochemistry of somatodendritic dopaminerelease in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopaminerelease. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 192–200, 1995.

HENRY, J. P., et al. Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter. **Advances in Pharmacology**, v. 42, p. 236-923, 1998.

HESLOP, K. E.; CURZON, G. Effect of reserpine on behavioural responses to agonists at 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, and 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtypes. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 883-891, 1999.

HILLS, T., et al. Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 1217-1225, 2004.

HIRONAKA, N., et al. Food-reinforced operant behavior in dopamine transporter knockout mice: enhanced resistance to extinction. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1025, p. 140-145, 2004.

HO, C. T., et al. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. **Preventive Medicine**, v. 21, p. 520-525, 1992.

HOPE, I. A. *C. elegans – A practical Approach*. New York, Oxford University Press, 1999.

HORTON, A. A.; FAIRHURST, S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 18, p. 27-79, 1987.

HORVITZ, H. R., et al. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 216, p. 1012-1014, 1982.

HUANG, C. L., et al. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. **J. Neurochem.**, v. 86, p. 1247-1259, 2003.

HUANG, C. X. C., KORNFELD, K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101(21), p. 8084-8089, 2004.

HUOTARI, M., et al. Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyltransferase-disrupted mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, p. 1309-1316, 2002.

INNIS, R. B., et al. Single-photon emission computed topographic imaging demonstrated loss of striatal dopamine transporters in Parkinson's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 11965-11969, 1993.

INOUE, M., et al. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 204, p. 898-904, 1994.

INOUE, M., et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, p. 1526-1530, 1995.

ISHIGURO, H., et al. Enhancement of oxidative damage to cultured cells and *Caenorhabditis elegans* by mitochondrial electron transport inhibitors, **IUBMB Life**, v. 51, p. 263-268, 2001.

JAMME, I., et al. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, p. 333-337, 1995.

JAYANTHI, L. D., et al. The *Caenorhabditis elegans* gene T23G5.5 encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. **Mol. Pharmacol.**, v. 54, p. 601-609, 1998.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Neuroscience**, v. 9, p. 665-677, 2008.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, v. 344, p. 796-768, 1994.

JESTE, D. V., et al. Tardive dyskinesia-reversible and persistent. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 36, p. 585-590, 1979.

JL, J., et al. Genetic alteration in the dopamine transporter differentially affects male and female nigrostriatal transporter systems. **Biochem. Pharmacol.**, v. 78, p. 1401-1411, 2009.

JICHA, G. A.; SALAMONE, J. D. Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to Parkinsonian symptoms. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 3822-3929, 1991.

JOMOVA, K.; VALKO, A. Advances in metal-induced oxidative stress and human diseases. **Toxicology**, v. 283, p. 65-87, 2011.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, p. 387-398, 2006.

KANDEL, E. R. Disorders of mood depression. In: Kandel, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Eds.), **Principles of Neural Science**, 3 th ed. Elsevier, New York, p. 869-889, 1991.

KANE, J. M., et al. Integrating incidence and prevalence of tardive dyskinesia. **Psychopharmacol. Bull.**, v. 22, p. 254-259, 1986.

KANE, J. M. Tardive dyskinesia: epidemiology and clinical presentation. In: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Eds.), **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**, v. 39. Raven Press, New York, p. 1485-1495, 1995.

KANG, L., et al. *C. elegans* TRP family protein TRP-4 is a pore-forming subunit of a native mechanotransduction channel. **Neuron**, v. 67, p. 381-391, 2010.

KAUR, S.; STARR, M. S. Antiparkinsonism action of dexamethorphan in the reserpine-treated mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 280, p. 159-166, 1995.

KAWADA, M., et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. **Anticancer Drug Des.**, v. 12, p. 847-852, 2001.

KELLEY, A., et al. Cholinergic stimulation of the ventrolateral striatum elicits mouth movements in rats: pharmacological and regional specificity. **Psychopharmacology**, v. 99, p. 542-549, 1989.

KILTY, J. E., et al. Cloning and expression of a cocaine sensitive rat dopamine transporter. **Science**, v. 254, p. 578-579, 1991.

KIM, Y. J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 1052-1055, 2007.

KINDT, K. S., et al. Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. **Neuron**, v. 55, p. 662-676, 2007.

KLAWANS, H. L.; RUBOVITS, R. An experimental model of tardive dyskinesia. **J. Neural Transm.**, v. 33, p. 235- 246, 1972.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Ann. Intern. Med.**, v. 93, p. 480-489, 1980.



KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KONAT, G. W. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. **J. Biosci.**, v. 28, p. 57-60, 2003.

KROES, B. H., et al. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med.**, v. 58, p. 499-504, 1992.

LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 13091-13096, 1998.

LAMBERTH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 181-189, 2004.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.

LEE, H. R., et al. Altered expression of gamma-secretase components in animal model of major depressive disorder induced by reserpine administration. **Lab. Anim. Res.**, v. 28, p. 109-114, 2012.

LEES, G. F., et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neurosci. Lett.**, v. 120, p. 159-162, 1990.

LEES, A. J., et al. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, p. 2055-2066, 2009.

LENAZ, G., et al. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. **Acta Biochim. Pol.**, v. 46, p. 1-21, 1999.

LESTER, H. A., et al. Permeation properties of neurotransmitter transporters. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 34, p. 219-249, 1994.

LI, S.; STYS, P. K. Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na<sup>(+)</sup>-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v. 107, p. 675-683, 2001.

LIAU, V. H., et al. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Mech. Ageing Dev.**, v. 132, p. 480-487, 2011.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO: *in vitro* and *in vivo* study. **Free Radical Biol. Med.**, v. 16, p. 29-33, 1994.

LOCKWOOD, T. D. Redox control of protein degradation. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 2, p. 851-878, 2000.

LOHR, J. B., et al. Increased indices of free radical activity in the cerebrospinal fluid of patients with tardive dyskinesia. **Biol. Psychiatry**, v. 28, p. 535-539, 1990.

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

LOHR, J. B., et al. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs**, v. 17, p. 47-62, 2003.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. **Neuroscience**, v. 3, p. 932-943, 2002.

LOWRY, O. H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, K. H., et al. Dual SPECT of dopamine system using [99mTc] TRODAT-1 and [<sup>123</sup>I]IBZM in normal and 6-OHDA-lesioned formosan rock monkeys. **Nucl. Med. Biol.**, v. 29, p. 561-567, 2002.

MANSOURI, M. T., et al. The effect of *Pistacia vera* L. gum extract on oxidative damage during experimental cerebral ischemia reperfusion in rats. **Iran Biomed. J.**, v. 9, p. 181-5, 2005.

MANSOURI, M. T., et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1028-1033, 2013.

MARCHITTI, S. A., et al. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. **Pharmacol. Rev.**, v. 59, p. 125-150. 2007.

McDONALD, P. W., et al. Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 26, p. 593- 618, 2006.

McDONALD, P.W., et al. Vigorous Motor Activity in *Caenorhabditis elegans* Requires Efficient Clearance of Dopamine Mediated by Synaptic Localization of the Dopamine Transporter DAT-1. **J. Neurosci.**, v. 27, p. 14216-14227, 2007.

MEDVEDEV, I. O., et al. Characterization of conditioned place preference to cocaine in congenic dopamine transporter knockout female mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 180, p. 408-413, 2005.

MENZAGHI, F., et al. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 280, p. 393-401, 1997.

MÉTZGER, R. R., et al. Inhibitory effect of reserpine on dopamine transporter function. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 456, p. 39-43, 2002.

MILNE, G. L., et al. Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 15533-15537, 2008.

MIYAMOTO, S., et al. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Mol. Psychiatry.**, v. 10, p. 79-104, 2005.

MIYASAKA, T., et al. Progressive neurodegeneration in *C.elegans* model of tauopathy. **Neurobiol. Dis.**, v. 20, p. 372-383, 2005.

MOCKO, J. B., et al. Phenothiazines interfere with dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.**, v. 40, p. 120-129, 2010.

MOREL, P., et al. Effects of 4hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in rat striatal synaptosomes. **Neurochem. Int.**, v. 33, p. 531-540, 1998.

MORROW, J. D., et al. In **Handbook of Antioxidants**, Vol. 2; Lester Packer and Enrique Cadenas/Marcel Dekker: New York, p 57-74, 2002.

MULLER, F. L., et al. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 49064-49073, 2004.

MURFITT, R. R., et al. Characterization of the mitochondria of the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 53, p. 423-430, 1976.

NAIDU, P. S., et al. Reversal of haloperidol-induced orofacial dyskinesia by quercetin, a bioflavonoid. **Psychopharmacology**, v. 167, p. 418-423, 2003.

NAIDU, P. S., et al. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. **Pharmacology**, v. 70, p. 59-67, 2004.

NAKAGAWA, T., et al. Effects of dopaminergic agents on reversal of reserpine-induced impairment in conditioned avoidance response in rats. **Pharmacol., Biochem. Behav.**, v. 58 p. 829-836, 1997.

NASS, R., et al. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 99, p. 3264-3269, 2002.

NASS, R.; BLAKELY, R. D. The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 521-544, 2003.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. Abnormal involuntary movement scale. In: GuyW, editor. **Early clinical evaluation unit assessment manual**. Rockville (MD): US Department of Health and Human Services, p. 534-537, 1976.

NEGGA, R., et al. Exposure to glyphosate- and/or Mn/Zn-ethylene-bis- dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of gamma-aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotox. Res.**, v. 21, p. 281-290, 2012.

NEISEWANDER, J. L., et al. Behavioral and neurochemical effects of chronic administration of reserpine and SKF-38393 in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 257, p. 850-860, 1991a.

NEISEWANDER, J. L., et al. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. **Brain Res.**, v. 558, p. 27-35, 1991b.

NEISEWANDER, J. L., et al. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 79-84, 1994.

NEISEWANDER, J. L., et al. Effects of amphetamine and 6-hydroxydopamine and 6-hydroxydopamine lesions on reserpine-induced oral dyskinesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 305, p. 13-21, 1996.

PAL, C., et al. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. **Free Radical Bio. Med.**, v. 49, p. 258-267, 2010.

PANT, A., et al. Beta-caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Exp. Geront.**, v. 57, p. 81-95, 2014.

PAPAIIOANNOU, S., et al. Role of a FMRF amide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurobiol.**, v. 65, p. 304-319, 2005.

PARKER, J. A., et al. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 13318-13323, 2001.

PATEL, A., et al. A cocaine analog and a GBR analog label the same protein in rat striatal membranes. **Brain Res.**, v. 576, p. 173-174, 1992.

PATTERSON, B. D., et al. Prevalence of and risk factors for tardive dyskinesia in a Xhosa population in the Eastern Cape of South Africa. **Schizophr. Res.**, v. 76, p. 89-97, 2005.

PAVLOV, K. V., SOKOVOV, V. S. Electrogenic ion transport by Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Membr. Cell Biol.**, v. 13, p. 745-788, 2000.

PEET, M., et al. Tardive dyskinesia, lipid peroxidation and sustained amelioration with vitamin E treatment. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 8, p. 151-153, 1993.

PEREIRA, A. C. C. I.; BEL, E. D. Metilfenidato – principal tratamento para o déficit de atenção e hiperatividade: características neuroquímicas e seus efeitos em modelos experimentais. **Neurobiologia**, v. 73, p. 127-137, 2010.

PEREIRA, R. P., et al. *Valeriana officinalis* ameliorates vacuuous chewing movements induced by reserpine in rats. **J. Neural Transm.**, v. 118, p. 1547-1557, 2011.

POLEWSKI, K., et al. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. **Curr. Top. Biophys.**, v. 26, p. 217-227, 2002.

POWELL, S. B., et al. MDMA“ecstasy” alters hyperactive and perseverative behaviors in dopamine transporter knockout mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 173, p. 310-317, 2004.

PU, P.; WEIDONG, L. Dopamine neuron degeneration induced by MPP<sup>+</sup> is independent of CED-4 pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Res.**, v. 18, p. 978-981, 2008.

RANG, H. P., et al. **Farmacologia**. 7<sup>a</sup> edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RECKZIEGEL, P., et al. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. **Toxicol. Lett.**, v. 203, p. 74-81, 2011.

REDDY, R. D.; YAO, J. K. Free radical pathology in schizophrenia: a review. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 55, p. 33-43, 1996.

REIS, E. M.; et al. Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. **Biomed. Res. Int.**, doi: 10.1155/2014/958209, 2014.

RICE, M. E. Distinct regional differences in dopamine-mediated volume transmission. **Prog. Brain Res.**, v. 125, p. 277-290, 2000.

RIDDLE, D. L., et al. *C. elegans II*. Nova Iorque, EUA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1222, 1997.

RINGSTAD, N., et al. Ligand-gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. elegans*. **Science**, v. 325, p. 96-100, 2009.

RODRIGUIZ, R. M., et al. Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. **Behav. Brain Res.**, v. 148, p. 185-198, 2004.

ROMERO-CALVO, I., et al. Reversible ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal. Biochem.**, v. 401, p. 318-320, 2010.

RUAN, Q., et al. VPS41, a protein involved in lysosomal trafficking, is protective in *Caenorhabditis elegans* and mammalian cellular models of Parkinson's disease. **Neurobiol.Dis.**, v. 37, p. 330-338, 2010.

RUBINSTEIN, M., et al. Adaptative mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treated mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, p. 810-816, 1990.

RUDNICK, G., et al. Energetics of reserpine binding and occlusion by the chromaffin granule biogenic amine transporter. **Biochemistry**, v. 29, p. 603-608, 1990.

SACHDEV, P., et al. The preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin E) in a rat model of tardive dyskinesia. **Biol. Psychiatry**, v. 46, p. 1672-1681, 1999.

SAHARIA, K., et al. Reserpine modulates neurotransmitter release to extend lifespan and alleviate age-dependent A $\beta$  proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Exp. Geront.**, v. 47, p. 188-197, 2012.

SALAMONE, J.; BASKIN, P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, p. 179-183, 1996.

SALAMONE, J. D., et al. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, p. 591-611, 1998.

SALAMONE, J. D., et al. Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: possible relevance to parkinsonism. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 14, p. S130-134, 2008.

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

SANYAL, S., et al. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J.**, v. 23, p. 473-482, 2004.

SAWIN, E. R. **Genetic and cellular analysis of modulated behaviors in *Caenorhabditis elegans***, PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology, 1996.

SAWIN, E. R., et al. *C.elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. **Neuron**, v. 26, p. 619-631, 2000.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biol. Med.**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHONECKER, M. Ein eigentümliches syndrom im oralen bereich bei egaphenapplikation. *neryenarzt* 28, 35. Apud: Casey, D.E. Tardive dyskinesia: reversible and irreversible? In: Casey, D.E., Chase, T.N., Christensen, A.V., Gerlach, J. (Eds.), **Dyskinesia, Research and Treatment**. Springer, Berlin, p. 89-97, 1985.

SCHOOLER, N. R.; KANE, J. M. Research diagnosis for tardive dyskinesia [letter]. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 39, p. 486-487, 1982.

SCHULTZ, W. Multiple dopamine functions at different time courses. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 30, p. 259-288, 2007.

SEAMANS, J. K.; YANG, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. **Prog. Neurobiol.**, v. 74, p. 1-58, 2004.

SEEMAN, P.; NIZNIK, H. B. Dopamine receptors and transporters in Parkinson's disease and schizophrenia. **FASEB J.**, v. 4, p. 2737-2744, 1990.

SERRANO, A., et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 350, p. 49-54, 1998.

SETTIVARI, R., et al. The divalent metal transporter homologues SMF-1/2 mediate dopamine neuron sensitivity in *Caenorhabditis elegans* models of manganism and parkinson disease. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 35758-35768, 2009.

SHAHRZAD, S., et al. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1207-1210, 2001.

SHIMADA, S., et al. Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. **Science**, v. 254, p. 576-578, 1991.



SIEGEL, G., et al. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. **American Society for Neurochemistry**. Academic Press., 7 edition, p. 1016, 2005.

SILVA, R. H., et al. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behav. Brain Res.**, v. 132, p. 171-177, 2002.

SINGLETON, V. L. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. **Adv. Food Res.**, v. 27, p. 149-242, 1981.

SISTRUNK, S. C., et al. Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: an in vitro study. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 23, p. 286-296, 2007.

SKALISZ, L. L., et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression-Parkinson's disease association. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 26, p. 879-883, 2002.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 24, p. 249-261, 1992.

SODERSTROM, K. E., et al. Animal models of Parkinson's disease. In: **Handbook of the neuroscience of aging**. Editors: HOF, P. R.; WOBBS, C. V. Elsevier., p. 455-463, 2009.

SRIVASTAVA, D., et al. Reserpine can confer stress tolerance and lifespan extension in the nematode *C. elegans*. **Biogerontology**, v. 9, p. 309-316, 2008.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv. Neurol.**, v. 44, p. 681-693, 1986.

STEINPREIS, R. E.; SALAMONE, J. D. Effects of acute haloperidol and reserpine administration on vacuous jaw movements in three different age groups of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 46, p. 405-409, 1993.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 177, p. 1-584, 1984.

STUCHLIK, A., et al. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. **Neurosci. Res.**, v. 58, p. 133-139, 2007.

SUGIURA, M., et al. Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurochem.**, v. 94, p. 1146-1157, 2005.

SULSTON, J., et al. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J. Comp. Neurol.**, v. 163, p. 215-226, 1975.

SULSTON, J. E.; HORVITZ, H. R. Post-embryonic cell lineages of nematode *Caenorhabditis elegans*. **Dev. Biol.**, v., 56, p. 110-156, 1977.

SUO, S., et al. Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. **Neurosci. Lett.**, v. 319, p. 13-16, 2002.

SUO, S., et al. Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. **J. Neurochem.**, v. 86, p. 869-878, 2003.

SUSSMAN, A. N., et al. Acute reserpine administration elicits long-term spontaneous oral dyskinesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 337, p. 157-160, 1997.

TAUFFENBERGER, A., et al. Evaluation of longevity enhancing compounds against transactive response DNA-binding protein-43 neuronal toxicity. **Neurobiol. Aging**, v. 34, p. 2175-2182, 2013.

TEIXEIRA, A. M., et al. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: Behavioral and antioxidant evaluations. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 88, p. 465-472, 2008.

TEIXEIRA, A. M., et al. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 92, p. 231-235, 2009.

THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, p. 2012-2018, 1998.

THOMAS, B.; BEAL, M. F. Parkinson's disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 16, p. R183-R194, 2007.

THOMAS, T., et al. MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation-relevance in a mouse model of Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v. 105, p. 2039-2052, 2008.

TILLERSON, J. L. et al. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. **Behav. Brain Res.**, v. 172, p. 97-105, 2006.

TITUS, K.; MICHAEL, O. H. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, p. 387-399, 2006.

TOTH, M. L., et al. Neurite sprouting and synapse deterioration in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 8778-8790, 2012.

TREVISAN, G., et al. Transient receptor potential ankyrin receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents. **Arthritis Rheum.**, v. 65, p. 2984-2995, 2013.

TREVIZOL, F., et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behav. Brain Res.**, v. 221, p. 13-18, 2011.

TSALIK, E. L., et al. LIM homeobox gene-dependent expression of biogenic amine receptors in restricted regions of the *C. elegans* nervous system. **Dev. Biol.**, v. 263, p. 81-102, 2003.

UHRBRAND, L.; FAURBYE, A. Reversible and irreversible dyskinesia after treatment with perphenazine, chlorpromazine, reserpine and electroconvulsive therapy. **Psychopharmacologia**, v. 1, p. 408-418, 1960.

VALKO, M., et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANDUYN, N., et al. SKN-1/Nrf2 inhibits dopamine neuron degeneration in a *Caenorhabditis elegans* model of methyl mercury toxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 118, p. 613-624, 2010.

VANDUYN, N., et al. The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration. **J. Neurochem.**, v. 124, p. 147-157, 2013.

VED, R., et al. Similar patterns of mitochondrial vulnerability and rescue induced by genetic modification of alphasynuclein, parkin, and DJ-1 in *Caenorhabditis elegans*, **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 42655-42668, 2005.

VENDEMIALE, G., et al. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 29, p. 49-55, 1999.

VERMA, S., et al. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environ. Toxicol. Phar.**, v. 35, p. 473-485, 2013.

VILLARINHO, J. G., et al. Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 690, p. 107-114, 2012.

VITAL, M. A. B. F., et al. Effects of monosialoganglioside on a new model of tardive dyskinesia. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 21, p. 1169-1179, 1997.

VOLZ, H. P., GLEITER, C. H. Monoamine oxidase inhibitors. A perspective on their use in the elderly. **Drug Aging**, v. 13, p. 341-355, 1998.

WALKER, A. K., et al. A conserved transcription motif suggesting functional parallels between *Caenorhabditis elegans* SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins, **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22166-22171, 2000.

WILLIAMS, B. J.; PIRCH, J. H. Correlation between brain adenylyl cyclase activity and spontaneous motor activity in rats after chronic reserpine treatment. **Brain Res.**, v. 68, p. 227-234, 1974.

WINTLE, R. F.; TOL, H. H. M. V. Dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans* – potential for parkinsonism research. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 7, p. 177-183, 2001.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 609-614, 2003.

WOLFARTH, S.; OSSOWSKA, K. Can supersensitivity of rodents to dopamine be regarded as a model of tardive dyskinesia? **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 13, p. 789-840, 1989.

WOLOZIN, B.; GOLTS, N. Iron and Parkinson's disease. **Neuroscientist**, v. 8, p. 22-32, 2002

WOOD, W. B. Introduction to *C. elegans* biology. In: WOOD, WB. **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor, p. 243-335, 1988.

WormAtlas. Edit. ALTUN, Z. F.; HERNDON, L. A.; CROCKER, C.; LINTS, R.; HALL, D. H. Disponível online em: <http://www.wormatlas.org> , 2009.

WormBase. releaseWS236. Disponível online em <http://www.wormbase.org> , 2013.

YANIV, Z.; BACHRACH, U. **Handbook of Medicinal Plants**. CRC Haworth Press, Binghamton, NY, USA, 2005.

YASSA, R.; JESTE, D. V. Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. **Schizophr. Bull.**, v. 18, p. 701-715, 1992.

YIN, H.; PORTER, N. A. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Antiox. Redox Signaling**, v. 7, p. 170-184, 2005.

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.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. S287-S296, 2006.

YOUDIM, M. B. H., et al. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 295-309, 2006.