



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE BIOMEDICINA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CARCINOGÊNICO DO
DICLORIDRATO DE PRAMIPEXOL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

NATHALYA PEREIRA BARBOSA

UBERLÂNDIA
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE BIOMEDICINA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CARCINOGÊNICO DO
DICLORIDRATO DE PRAMIPEXOL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

NATHALYA PEREIRA BARBOSA

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Coorientadora: MSc. Maria Paula Carvalho Naves

**Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à
Universidade Federal de Uberlândia como
exigência parcial para a obtenção do Título de
Bacharel em Biomedicina.**

UBERLÂNDIA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE BIOMEDICINA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CARCINOGÊNICO DO
DICLORIDRATO DE PRAMIPEXOL EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

NATHALYA PEREIRA BARBOSA

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó – IBTEC/UFU
Orientador

Profa. Dra. Sandra Morelli – IBTEC/UFU
Membro Titular

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior – IBTEC/UFU
Membro Titular

Uberlândia (MG), 22 de outubro de 2019

UBERLÂNDIA
2019

Dedico este trabalho especialmente à minha família e namorado, sem os quais eu não teria o apoio necessário para seguir meus sonhos. Obrigada por serem meu alicerce durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus pela força, paciência e determinação para concluir mais uma etapa da vida.

Agradeço à minha mãe, Carla, pelo apoio incondicional, pelas longas conversas, pelo carinho, exemplo, sabedoria e conselhos que foram e continuam sendo fundamentais para as minhas tomadas de decisões. Agradeço meu pai, Ricardo, por todo o esforço para dar a mim e às minhas irmãs a melhor educação possível; sem seu trabalho e apoio, eu não estaria aqui. Às minhas irmãs, Talytha e Amanna, pelos anos que dividimos nossas infâncias, e por terem se tornado exemplos de mulheres incríveis e corajosas, que me inspiram e auxiliam a seguir meus sonhos.

Ao meu namorado, Gustavo, pelas palavras e atitudes de conforto, pelo carinho e paciência imensuráveis, que são fundamentais para suportar as dificuldades da vida. Sem seu apoio emocional e leveza eu não teria conseguido passar pelas tribulações da graduação.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, por todas as dicas, conselhos e momentos ao longo dessa trajetória. Tenho muito orgulho por ter recebido um pouco do seu conhecimento acadêmico e ético e espero poder espalhá-lo por onde eu for.

Agradeço à minha co-orientadora MSc. Maria Paula Carvalho Naves por toda a ajuda, e pela companhia nos longos dias de análise e experimentação. Sem sua orientação e ensinamentos eu não teria realizado esse trabalho.

Agradeço também à banca examinadora pela disponibilidade, avaliação, sugestões e opiniões dadas a essa monografia.

Agradeço ao meu colega de laboratório Cássio Resende por se prontificar a responder dúvidas e auxiliar nas análises estatísticas do trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia pela disposição de recursos, e a todos os técnicos, professores e amigos que fizeram parte da minha jornada até aqui, devo a vocês a minha formação acadêmica.

E à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica ao projeto que culminou nesta monografia.

A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO

O Dicloridrato de Pramipexol (PPX) é um agonista não-ergolínico utilizado no tratamento da Doença de Parkinson (DP), podendo ser prescrito como monoterapia na fase inicial da DP, ou associado à Levodopa, nos estágios mais avançados da doença. Recentemente, o PPX tem sido utilizado também no tratamento da Síndrome das Pernas Inquietas e em distúrbios psiquiátricos. Apesar das vantagens do uso do PPX, existem diversos efeitos colaterais causados pelo mesmo, entre os quais, problemas cardíacos, endócrinos, além de ser um dos possíveis causadores do aumento da incidência de melanomas em pacientes com DP. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do PPX em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram realizados dois testes, o “*Somatic Mutation and Recombination Test*” - SMART (Teste para detecção de mutação e recombinação somática) e o “*Epithelial Tumor Test*” - ETT (Teste para Detecção de Tumores Epiteliais). Para o SMART, foram realizados dois cruzamentos: Cruzamento padrão (Standard cross - ST), no qual fêmeas *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* foram cruzadas com machos *mwh* e; Cruzamento de alta bioativação (High bioactivation cross - HB), no qual fêmeas *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* foram cruzadas com machos *mwh*. Larvas de terceiro estágio ($72 \pm 4h$), resultantes de ambos os cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações de PPX (0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL). Água ultrapura e Uretano (10 mM) foram usados, respectivamente, como controles negativo e positivo. Nenhuma das concentrações utilizadas apresentou efeito tóxico e/ou mutagênico. Para o ETT fêmeas virgens *wts/TM3, Sb^I* foram cruzadas com machos *mwh*. Larvas de terceiro estágio ($72 \pm 4h$), provenientes desse cruzamento, foram tratadas com as mesmas concentrações utilizadas no SMART. Como controle positivo foi utilizado a Doxorrubicina 0,4 mM e foram analisados os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH). O PPX induziu aumento significativo na frequência de tumores epiteliais em todas as concentrações testadas. Diante da falta de dados na literatura e do aumento da prescrição do PPX em face ao envelhecimento populacional, são necessários mais estudos para elucidar a relação deste fármaco com mecanismos genéticos, epigenéticos, citotóxicos e imunes, a fim de que o mesmo possa ser utilizado com segurança.

LISTA DE ABREVIATURAS

BH	Heterozigoto-balanceado
CE	Corpo estriado
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
COMT	Catecol-O-metiltransferase.
DAT	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOP	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ETT	Teste para detecção de tumores epiteliais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HB cross	Cruzamento de alta bioativação
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
MAO-B	Monoamina oxidase-B
MG	Mancha gêmea
MH	Trans-heterozigoto marcado
MSP	Mancha simples pequena
MSG	Mancha simples grande
PPX	Dicloridrato de pramipexol
SMART	Teste para detecção de mutação e recombinação somática
SN	Substância Negra
SNpc	Região pars compacta da Substância Negra
ST cross	Cruzamento padrão
TH	Tirosina-hidroxilase
TM	Total de manchas

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação da via nigroestriatal em um cérebro normal (A) e um cérebro com Doença de Parkinson (DP) (B). (C) Marcação imuno-histoquímica dos Corpos de Lewy, na Substância Negra (SN) de pacientes com DP - Esquerda: Compostos por Sinucleína; e Direita: Compostos por Ubiquitina.....	12
Figura 2. (A) Substância Negra (SN) com despigmentação devido à perda de neurônios dopaminérgicos na Doença de Parkinson (DP). (B) SN com pigmentação normal. (TH-C) SNpc normal, sem perda da tirosina-hidroxilase. (TH-D) SNpc com diminuição da enzima devido à DP. (E) Fibrilas feitas de agregados insolúveis de α -sinucleína depositada nos corpos de neurônio, formando os Corpos de Lewy.....	13
Figura 3. Fórmula estrutural do Dicloridrato de Pramipexol.....	16
Figura 4. <i>Drosophila melanogaster</i> macho e fêmea.....	18
Figura 5. Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Figura 6. Esquema representativo do Cruzamento Padrão (ST), Cruzamento de Alta Bioativação (HB), e os indivíduos resultantes.....	22
Figura 7. Esquema representativo do Cruzamento realizado no ETT e os indivíduos resultantes.....	24
Figura 8. Taxa de sobrevivência dos indivíduos dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações e contabilizados em dias distintos, sendo (A) 7º dia após tratamento; e (B) 10º dia após tratamento.....	26

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de Dicloridrato de Pramipexol, Controle positivo (Uretano 10 mM) e Controle negativo (Água Ultrapura).....	29
Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de Dicloridrato de Pramipexol, Controle positivo (Uretano 10 mM) e Controle negativo (Água Ultrapura).....	30
Tabela 3. Frequência de clones de tumores epiteliais observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor <i>wts</i> em <i>Drosophila melanogaster</i> , tratadas com diferentes concentrações de Dicloridrato de Pramipexol, Controle positivo (Doxorrubicina 0,4 mM) e Controle negativo (Água Ultrapura).....	33

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Doença de parkinson.....	11
1.2. Dicloridrato de pramipexol.....	15
1.3. Drosophotoxicologia, SMART e ETT.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Compostos químicos e meio de cultura.....	21
4.2. Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i>.....	21
4.3. Teste para a detecção de tumores epiteliais (ETT)	23
4.4. Análise estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Teste de sobrevivência.....	25
5.2. Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i>.....	26
5.3. Teste para a detecção de tumores epiteliais (ETT)	31
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de parkinson

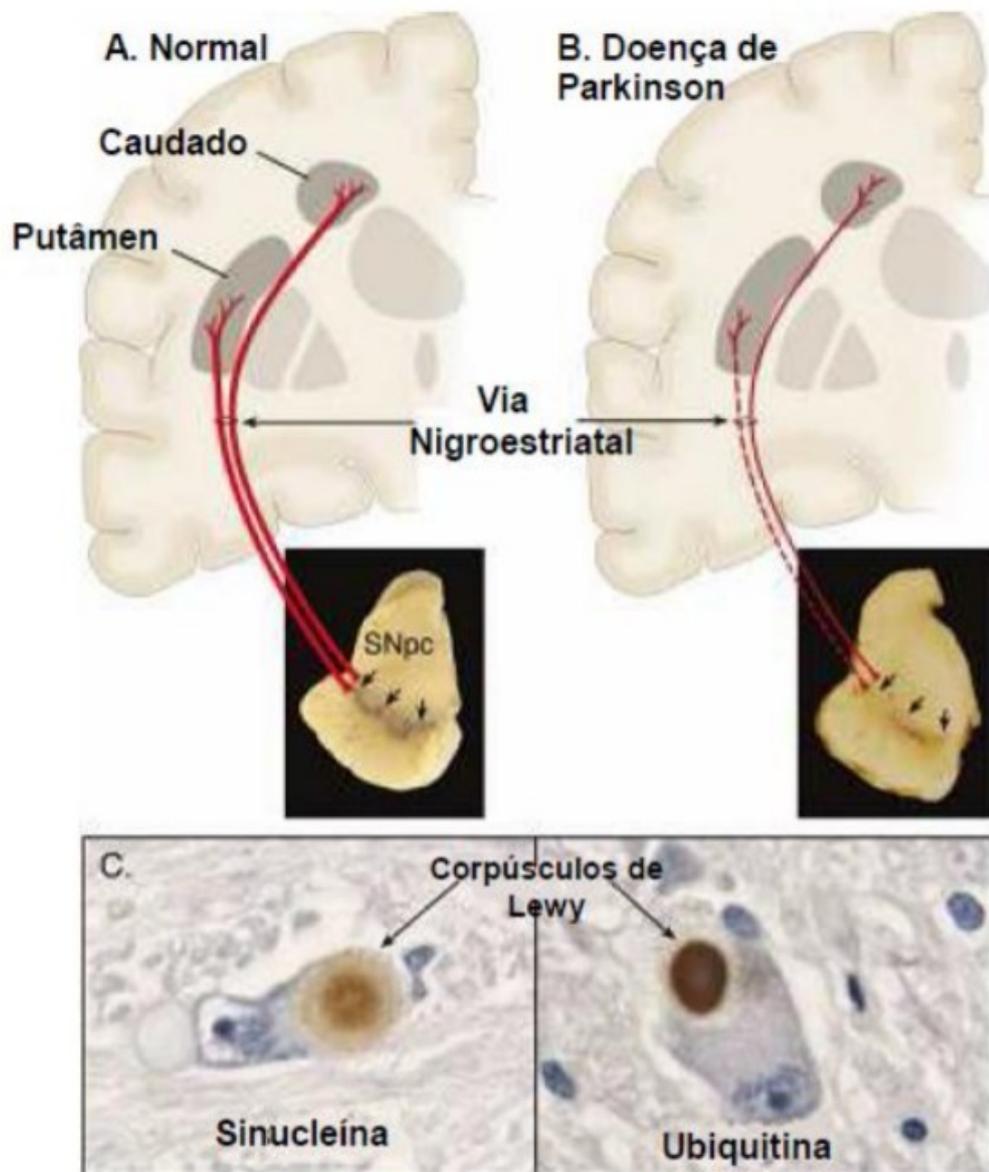
A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada, principalmente, por alterações motoras, tais como: tremor, rigidez muscular, instabilidade postural, bradicinesia, acinesia, hipocinesia, hipomimia e dificuldade de engolir a saliva (ALEXANDER, 2004; JANKOVIC, 2008).

Já está bem estabelecido que a DP não é somente um distúrbio de movimento (WEINTRAUB; BURN, 2011). Além dos sintomas motores, há os chamados sintomas não-motores. Entre eles estão: queda de pressão ortostática, disfunção dos esfínteres, anormalidades cognitivas e neurocomportamentais, tais como: demência, depressão, apatia, ansiedade, alucinações, e comportamentos obsessivos-compulsivos, conhecidos como “desregulação homeostática hedonista”, que envolvem hipersexualidade, compulsão por jogos de azar e compras (AARSLAND *et al.*, 2001; MIYASAKI *et al.*, 2007; PALMITER, 2007; SWINN *et al.*, 2003). A depressão e apatia estão entre os maiores sintomas neuropsiquiátricos da DP: em um estudo desenvolvido com 537 pacientes, 58% apresentaram depressão e 54% apatia (AARSLAND *et al.*, 2007), sendo que de 20 a 25% usam antidepressivos em algum momento durante o curso da doença (ALTHAUS *et al.*, 2008; SMITH; EYAL; WEINTRAUB, 2015). Os sintomas de compulsão podem estar relacionados com o uso de drogas dopaminérgicas, principalmente os agonistas de Dopamina (DOP). Porém os mecanismos desencadeadores destes comportamentos não estão totalmente elucidados, assim como os que levam às disfunções cognitivas e comportamentais citadas anteriormente (WEINTRAUB *et al.*, 2006).

A maior causa dos sintomas motores da doença é a degeneração de neurônios dopaminérgicos na região pars compacta da Substância Negra (SNpc), o que leva à sua despigmentação. A perda neuronal resulta na falta de Dopamina na via nigroestriatal dopaminérgica no mesencéfalo, da qual a SN faz parte e que tem como um dos alvos o Corpo Estriado (CE), composto pelo Núcleo Caudado e pelo Núcleo Lentiforme (conjunto do Putâmen e do Globo Pálido) (**Fig. 1A e B**) (TYNES; STORSTEIN, 2017). As disfunções responsáveis por essa degeneração podem ser celulares, como estresse oxidativo, defeitos na respiração mitocondrial e agregação anormal de proteínas; ou genéticos, como alterações no gene codificador da proteína α -sinucleína, que levam ao mal dobramento e ao aumento da agregação desta proteína, e a disfunção da via da ubiquitina-proteassoma, ambas proteínas se acumulam na SN do cérebro, formando inclusões celulares citoplasmáticas eosinofílicas chamadas de Corpos de Lewy (**Fig. 1C**) (DAUER; PZERDBORSKI, 2003).

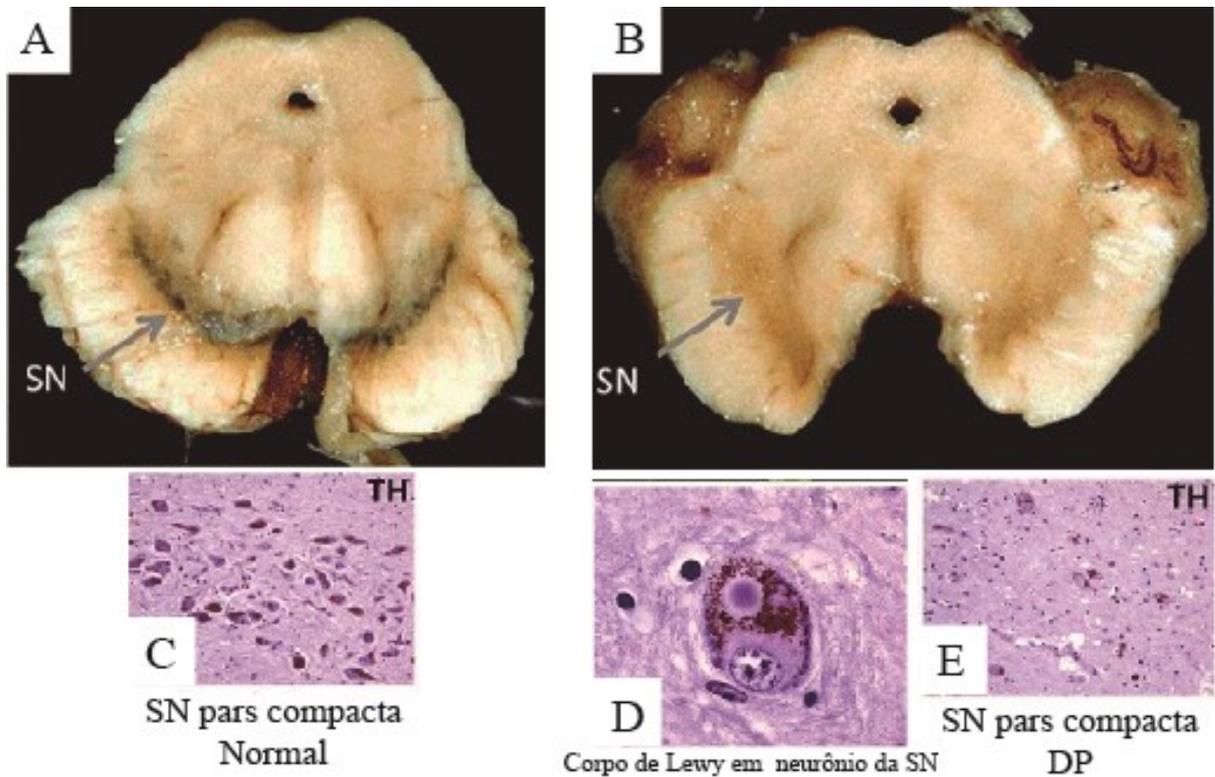
Portanto, pacientes com DP apresentam perda de neurônios dopaminérgicos, com consequente despigmentação da SN, diminuição da enzima tirosina-hidroxilase (TH), sintetizadora de DOP, e fibrilas de agregados insolúveis de α -sinucleína depositada nos corpos de neurônios, formando Corpos de Lewy (**Fig. 2**).

Figura 1. Representação da via nigroestriatal em um cérebro normal (A) e um cérebro com DP (B). (C) Marcação imuno-histoquímica dos Corpos de Lewy, na SN de pacientes com DP - Esquerda: Compostos por Sinucleína e Direita: Compostos por Ubiquitina



(Fonte: Dauer; Przedborski, 2003).

Figura 2. (A) SN com pigmentação normal. (B) Substância Negra (SN) com despigmentação devido à perda de neurônios dopaminérgicos na Doença de Parkinson. (C) SNpc normal, sem perda da tirosina-hidroxilase. (D) Fibrilas feitas de agregados insolúveis de α -sinucleína depositada nos corpos de neurônio, formando os Corpos de Lewy. (E) SNpc com diminuição da tirosina-hidroxilase devido à doença



(Fonte: Adaptado de Mandel *et al.*, 2010).

1.1.1. Epidemiologia

A DP começa a se manifestar, majoritariamente, em indivíduos entre 65 e 70 anos e afeta cerca de 1% de toda a população mundial acima dos 60 anos. Sua prevalência é de 100 a 200 casos por 100.000 pessoas, atingindo uma incidência anual de 15 ocorrências a cada 100.000 indivíduos ao redor do mundo (LAU; BRETELER, 2006; TYNES; STORSTEIN, 2017). Assim, é evidente que mais casos da Doença de Parkinson surgirão, uma vez que é uma doença relativamente comum entre os idosos e a população mundial está ficando mais velha: hoje, 15% da população mundial é de idosos (acima de 65 anos), sendo que este número pode chegar a 25% até 2050 (CSIS, 2011).

No Brasil, por não ser uma doença de notificação compulsória, apesar do registro de cerca de 220 mil pacientes, esse valor pode ser muito mais alto, mais de 600 mil portadores da DP no país (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016; DORSEY *et al.*, 2007).

1.1.2. Tratamento

Os tratamentos mais comuns para o controle da DP são: o uso de drogas dopaminérgicas e anticolinérgicas, a palidotomia e o profundo estímulo cerebral, que procuram melhorar a sinalização axial (ROBERTS-WARRIOR *et al.*, 2000).

Um grande marco na terapia da DP foi a descoberta da Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina), um precursor de dopamina não específico, que ameniza os sintomas motores, porém é incapaz de substituir ou preservar os neurônios dopaminérgicos degenerados, gerando, também, muitos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, baixa pressão sanguínea, narcolepsia (sonolência abrupta), além de causar, a longo prazo, movimentos involuntários chamados “discinesias” (CENCI, 2014; DAUER; PZERDBORSKI, 2003; KRISHNA; ALI; MOUSTAFA, 2014). O medicamento também tem baixa eficácia na prevenção e tratamento de sintomas não-motores, como a depressão (FAWCETT *et al.*, 2016).

Os inibidores de enzimas também são utilizados na terapia medicamentosa, sendo que as duas enzimas alvo são a MAO-B (Monoamina Oxidase-B) e as COMT (Catecol-O-Metiltransferase). A MAO-B é responsável pela degradação da Dopamina e tem seu número aumentado no cérebro de pacientes com a DP. Portanto, diminuir a sua ação auxilia na manutenção dos níveis de DOP no sistema nervoso central (GEORGE *et al.*, 2009; KRISHNA; ALI; MOUSTAFA, 2014). Já a COMT tem uma ação indireta sobre a DOP, por meio da degradação do composto resultante da ação da MAO-B. Mesmo assim, sua inibição pode ser outra forma de tentar restaurar os níveis do neurotransmissor no cérebro (ANTONINI *et al.*, 2008; KORCZYN *et al.*, 2004).

Por fim, em relação ao tratamento farmacêutico dopaminérgico, os agonistas são amplamente prescritos, sendo os mais utilizados o Dicloridrato de Pramipexol (PPX) e o Ropinirol, que podem aumentar os níveis de DOP no cérebro e estimular receptores dopaminérgicos pré e pós-sinápticos, sendo mais eficazes nas fases iniciais da doença. Esses agonistas podem se distinguir pela afinidade a receptores diferentes. Entretanto, não se sabe se essas divergências são clinicamente relevantes (BROOKS, 2000; BURN, 2000).

Os fármacos agonistas dopaminérgicos antiparkinsonianos não geram flutuações do rendimento motor, nem discinesias nos pacientes que os usam a longo prazo. Por isso, são as drogas de escolha para evitar o uso prolongado do medicamento Levodopa, já que este está associado com alterações psiquiátricas, intolerância gastrointestinal, além do desenvolvimento de discinesias (GOETZ; PAL, 2014). Apesar disso, essas drogas não estão isentas de

provocarem efeitos colaterais importantes em seus usuários e são, usualmente, menos efetivas que a Levodopa (TINTNER; JANKOVIC, 2003).

De acordo com a FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), responsável pelo fornecimento do PPX para o SUS desde 2013, o fármaco, na rede pública, beneficia cerca de 20 mil pacientes. Desde que foi lançado em 1997, sob o nome registrado de Mirapex®, o PPX já foi receitado mais de 10 milhões de vezes ao redor do mundo, de acordo com Kate O'Connor (2015), diretora de Relações Públicas do laboratório formulador do medicamento; sendo o seu amplo uso um dos motivos para que este fármaco seja o foco do presente estudo.

Apesar do uso comum de drogas dopaminérgicas, novos estudos estão tentando encontrar possíveis tratamentos, tanto para os sintomas motores, como os não-motores, que afetam a qualidade de vida, a qualidade dos relacionamentos, além de gerarem o declínio físico e cognitivo dos pacientes (PONTONE *et al.*, 2016; SANTOS-GARCÍA, 2015; VAN UEM *et al.*, 2016). Pesquisas recentes, como o uso do Cannabidiol para amenizar sintomas neurocognitivos (CRIPPA *et al.*, 2019), e o uso de nanoagregados de ouro para evitar a agregação de proteínas α -sinucleína e reverter a perda de neurônios dopaminérgicos (GAO *et al.*, 2019), estão sendo desenvolvidas ao redor do mundo.

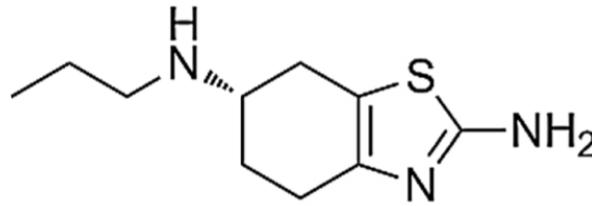
1.2. Dicloridrato de pramipexol

1.2.1. Mecanismo de ação

O Dicloridrato de Pramipexol (PPX) (**Fig. 3**) é um agonista não-ergolínico dopaminérgico aprovado em 1997 para o tratamento da DP. Desde então, é o agonista de DOP mais prescrito para o tratamento da doença (ANTONINI *et al.*, 2010). Inicialmente, o fármaco foi formulado em uma versão de liberação imediata, que deve ser ingerida três vezes ao dia. Posteriormente, uma fórmula de liberação prolongada foi lançada no mercado e requer apenas uma ingestão por dia, o que aumenta a adesão do paciente ao fármaco, melhorando o controle dos sintomas (POEWE *et al.*, 2011).

O PPX possui alta afinidade aos receptores de DOP da subfamília D₂ (receptores D₂, D₃ e D₄), apresentando maior predileção pelos receptores D₃, fator que pode contribuir com a sua eficácia tanto no aspecto motor da doença, como no psiquiátrico. Além disso, o fármaco apresenta baixa interação com receptores adrenérgicos e serotoninérgicos (PIERCEY, 1998; PIERCEY; HOFFMANN; SMITH, 1996).

Figura 3. Fórmula estrutural do Diclорidrato de Pramipexol



(Fonte: Silindir; Ozer, 2014)

Ainda não se conhece em detalhe o mecanismo de ação do PPX ou o motivo de sua maior afinidade por receptores D₃. O que se sabe é que os déficits motores são aliviados pela estimulação dos receptores dopaminérgicos dos neurônios do CE (CHWIEDUK; CURRAN, 2010). Além disso, o uso prolongado de agonistas dopaminérgicos D₃ leva à redução da recaptura de Dopamina na fenda sináptica pelos Transportadores de Dopamina (DAT), que perdem afinidade pelo neurotransmissor. Isso ocorre no CE e na SN do cérebro humano, locais onde se houver falta de DOP, não há a inibição de movimentos involuntários (CASTRO-HERNANDEZ *et al.*, 2015; GUTTMAN *et al.*, 2001).

1.2.2. Diferentes usos do PPX

O PPX pode ser receitado isoladamente para pacientes na fase inicial da DP ou fazer parte de uma terapia em conjunto com a Levodopa, nos estágios mais avançados da doença (BLANDINI; ARMENTERO, 2014). Um estudo de duplo cego, realizado pelo *Parkinson Study Group* (2000) mostrou que o PPX reduziu de forma significativa a incidência de discinesia e flutuações motoras em comparação à Levodopa (51% e 28% respectivamente); apesar do maior controle dos sintomas motores ter sido obtido pelo uso do precursor de DOP, 32% dos pacientes puderam seguir a monoterapia de PPX até a finalização do período do estudo (5 anos).

Outra aplicação relevante do PPX é no tratamento da Síndrome das Pernas Inquietas (SPI), caracterizada pela parestesia, disestesia e inquietação motora das pernas, agravada no repouso e à noite. Sua etiologia é desconhecida, podendo ser idiopática ou ter herança familiar autossômica dominante (WALTERS, 1995). Este fármaco, por ser um agonista seletivo para receptores D₃ não-ergolínico, apresentou os melhores resultados, em comparação com o uso da Levodopa e de outros agonistas de DOP ergolínicos que levam a um aumento dos sintomas e tolerância depois de alguns meses de uso (MONTPLAISIR *et al.*, 2000).

O uso do PPX também se estende à terapia de distúrbios psiquiátricos, como distúrbios bipolares, depressões resistentes e anedonia, sintomas também comuns em pacientes com DP

(FAWCETT *et al.*, 2016). Essa eficácia se deve majoritariamente pela presença de receptores D₃ no sistema mesolímbico, que está envolvido com os déficits motores e hedônicos da depressão (DUNLOP; NEMEROFF, 2007; RUSSELL *et al.*, 2004). O aumento de dopamina nesse sistema é uma via comum de diferentes classes de antidepressivos, como os inibidores de recaptura de serotonina, antidepressivos tricíclicos e inibidores da MAO (WILLNER; HALE; ARGYROPOULOS, 2005).

1.2.3. Efeitos adversos

O PPX causa sérios efeitos colaterais aos seus usuários, como náuseas, insônia, constipação, intensa sonolência e até mesmo alucinações (GOETZ; PAL, 2014; SHANNON, 1997). Além disso, em 2012, a FDA (*Food and Drug Administration*) publicou um aviso de segurança, alertando que pode haver uma relação entre insuficiência cardíaca e o uso do PPX. Em um teste clínico inicial de fase 1 foram administradas doses crescentes de PPX em 52 pacientes saudáveis do sexo masculino, analisando-se parâmetros como pressão sanguínea em repouso, batimentos cardíacos, pressão de pulso, e estresse pulsátil; observou-se o aumento clínico e estatístico significativos, sendo que dez pacientes foram removidos antecipadamente do estudo devido a necessidade de intervenção imediata como resposta ao grande aumento da pressão sanguínea e batimentos cardíacos (FARHA *et al.*, 2014). Além da ação cardiológica, percebe-se também um perfil endócrino, similar a outros agonistas de receptores dopaminérgicos da família D₂ (SCHILLING; ADAMUS; PALLUCK, 1992).

Nos testes toxicológicos de exposição intravenosa sub-crônica, desenvolvidos em ratos Wistar (linhagem Chbb: THOM), foi observado em fêmeas o aumento do peso e tamanho ovarianos, diminuição do tamanho do timo e leve queda do colesterol e em machos do mesmo grupo percebeu-se diminuição de triglicérides e potássio, e discreto aumento dos níveis de cloreto (HEALTH CANADA, 2019).

Outra complicação muito importante, que talvez se dê pelo uso do PPX está relacionada a um estudo realizado em 2016, que mostrou que pacientes com DP possuem de 7 a 10 vezes mais probabilidade de desenvolverem melanomas do que os não portadores. Os motivos pelos quais isso ocorre ainda não estão bem elucidados, uma vez que não há certeza se o desencadeador seria a própria doença ou os fármacos necessários para o seu controle (SHALABY; LOUIS, 2016). Porém, especula-se que as drogas antiparkinsonianas dopaminérgicas, como o PPX, possam aumentar esse risco (BERTONI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2010). A suspeita é tão reconhecida, que se recomenda aos usuários do

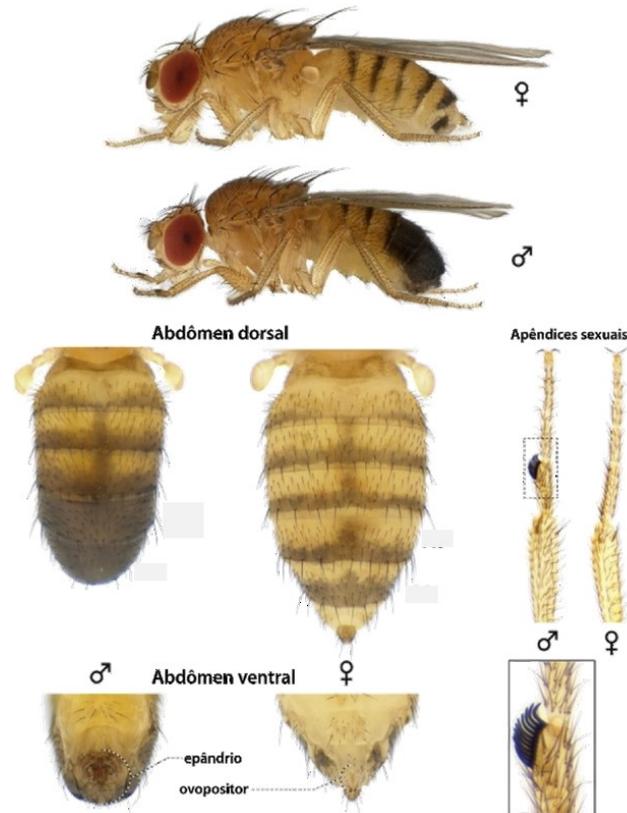
fármaco, sejam eles portadores ou não da DP, a realização de exames dermatológicos com frequência (FERREIRA *et al.*, 2010).

1.3. Drosophotoxicologia, SMART e ETT

Há tempos a comunidade científica internacional vem desenvolvendo um forte movimento pela diminuição do uso de mamíferos, tanto na experimentação científica, quanto para fins didáticos (RECH, 2013). Como lembrado por Flecknell (2002), a teoria dos “3Rs” (*Replacement, Reduction, Refinement*), criada por William Russel e Rex Burch afim de conscientizar o mundo científico do uso de animais em testes, vem ganhando mais força com o decorrer dos anos.

A *Drosophila melanogaster* é um inseto da Ordem Diptera, conhecida como “mosca das frutas”, que apresenta dimorfismo sexual (**Fig. 4**) e 2 mm de comprimento. O seu ciclo de vida é curto, com uma duração de 10 a 12 dias, durante o qual, na fase de pupa, ocorre a metamorfose, onde as células dos discos imaginais se proliferam e formam as estruturas adultas (CHYB; GOMPEL, 2013).

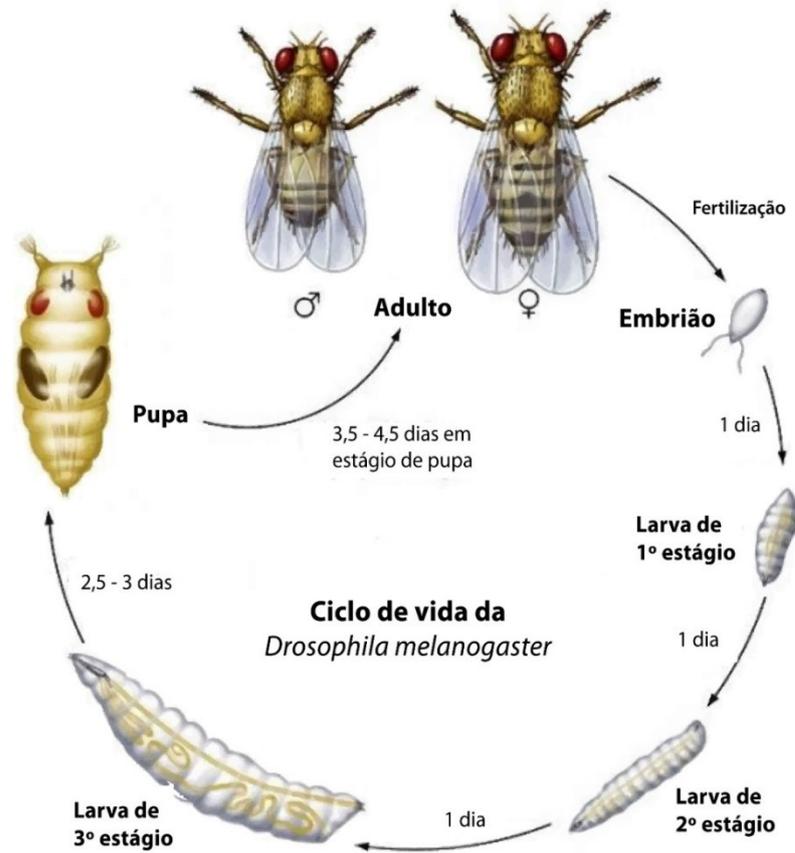
Figura 4. *Drosophila melanogaster* macho e fêmea, sendo estes distinguidos por três principais características: tamanho: as fêmeas são, em geral, maiores que os machos; cor: nos machos os segmentos do abdômen posterior são escuros e brilhantes, enquanto nas fêmeas essa coloração pode variar de clara até quase totalmente escura; morfologia externa: o abdômen das fêmeas possui uma ponta fina, enquanto dos machos é redondo e voltado para dentro, a genitália masculina é maior, mais complexa e mais escura que a das fêmeas, e somente os machos possuem pelos grossos nas patas dianteiras, chamados de apêndices sexuais.



(Fonte: Chyb; Gompel, 2013).

Sendo um organismo modelo alternativo, a *D. melanogaster* apresenta inúmeras vantagens, como o baixo custo, fácil manutenção das linhagens, ciclo de vida curto (**Fig. 5**), prole numerosa, susceptibilidade de manipulação genética, facilidade de detecção de fenótipos e, principalmente, homologia com o genoma de organismos mais complexos, chegando a 77% de homologia cos genes relacionados à doenças em humanos (CHIFIRIUC *et al.*, 2016; GRAF *et al.*, 1996; REITER *et al.*, 2001; STAATS *et al.*, 2018).

Figura 5. Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*



(Fonte: Adaptado de <http://puzzlefactory.pl/en/puzzle/play/animals/175852-life-cycle>).

A *D. melanogaster* é um modelo animal utilizado há mais de 1 século, sendo que, durante décadas, foi a base para entender as regras da transmissão genética que conhecemos hoje (ROBERTS, 2006). É um organismo eucarioto que desperta grande interesse científico como modelo para estudos de mutagenicidade, recombinogenicidade, anti-mutagenicidade, anti-recombinogenicidade, carcinogênese e anti-carcinogenicidade de diversos agentes genotóxicos (CHIFIRIUC *et al.*, 2016; GRAF *et al.*, 1996; MORAIS *et al.*, 2018; NAVES *et al.*, 2018).

O SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) criado por GRAF e colaboradores (1984), se baseia na análise de diferentes padrões de pelos nas asas da *D. melanogaster* para determinar a genotoxicidade de diferentes compostos. A perda da heterozigose nas possíveis linhagens originadas dos cruzamentos realizados, pode se dar por mutação, recombinação, deleção ou não-disjunção mitótica, levando à multiplicação de células alteradas e, conseqüentemente, o aparecimento de regiões de pelos mutados (chamadas de “manchas”) nas asas.

Outro teste que utiliza a *D. melanogaster* é o teste para a detecção de clones de tumores epiteliais (ETT – *Epithelial Tumor Test*). Há um grande interesse na indução de tumores em *Drosophila* pois estas conservam genes supressores de tumor (gene *wts*) e, devido à sua homologia com o DNA de humanos, facilita o entendimento de processos carcinogênicos nos mesmos (NISHIYAMA *et al.*, 1999; POTTER; TURENCHALK; XU, 2000). A perda de função desse gene leva à multiplicação de células invasivas, chamadas de *Warts* (verrugas), que podem aparecer ao longo do corpo do indivíduo (JUSTICE *et al.*, 1995).

2. JUSTIFICATIVA

A Doença de Parkinson é uma enfermidade que apresenta elevada prevalência em todo o mundo, com previsões de aumento conforme o envelhecimento das populações. Sendo assim, o Dicloridrato de Pramipexol, agonista dopaminérgico de escolha para o tratamento da doença, apresenta cada vez mais significância neste cenário. Diante das suas diversas aplicações, como no tratamento de sintomas motores e não-motores da DP, de transtornos psiquiátricos e da Síndrome das Pernas Inquietas, além dos malefícios e contradições supracitados, percebe-se a importância de mais estudos e investigações sobre a segurança do uso deste fármaco.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial mutagênico, recombinogênico e carcinogênico do PPX em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade do PPX por meio do Teste de Sobrevivência em *D. melanogaster*;
- Avaliar a mutagenicidade e recombinogenicidade do PPX por meio do SMART em células somáticas de asas de *D. melanogaster*;
- Determinar o potencial carcinogênico do PPX por meio do ETT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Compostos químicos e meio de cultura

Dicloridrato de Pramipexol ((S)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilamina-benzothiazol dihidrocloridrato), fabricado por Boehringer Ingelheim – Pharma, Alemanha, CAS: 104632-26-0; água ultrapura (18.2 MΩ); uretano 10 mM (Etil-carbamato – CAS: 51-79-6, Buchs, Suíça).

4.2. Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

4.2.1 Linhagens de *D. melanogaster*

Foram utilizadas três linhagens mutantes: fêmeas flr^3 ($flr^3/In(3LR)TM3$, ri pp sep $I(3)89Aa$ bx^{334e} e Bd^s); fêmeas $ORR;flr^3$ (ORR ; $flr^3/In(3LR)TM3$, ri pp sep $I(3)89Aa$ bx^{34e} e Bd^s); e machos mwh (mwh/mwh).

Os indivíduos foram mantidos em estufa B.O.D. (*Biologic Oxigen Demand*) (Tecnal – Equipamentos para Laboratório Ltda. Piracicaba, SP), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperaturas de $25 \pm 1^\circ C$.

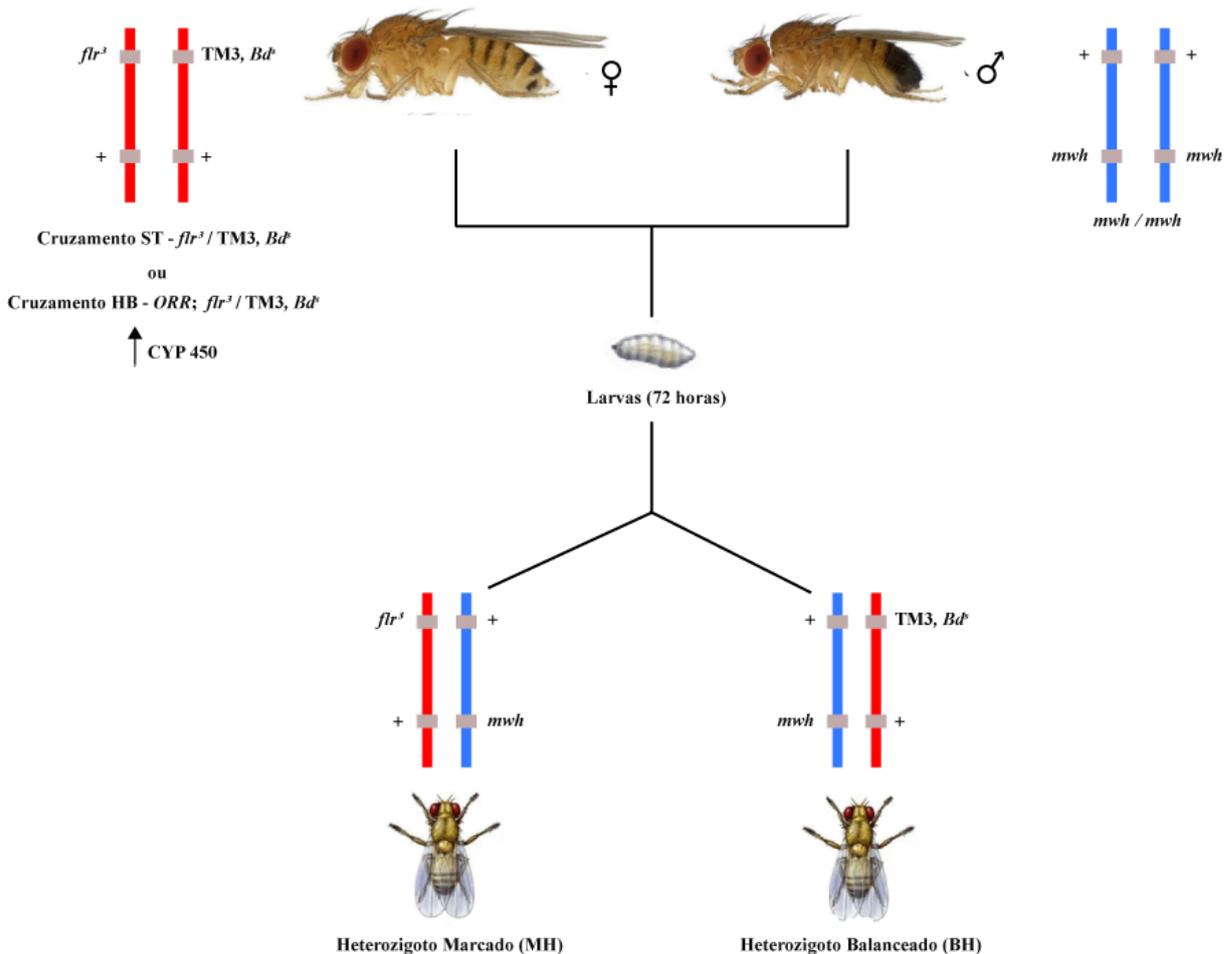
4.2.2. Cruzamentos

Foram realizados dois cruzamentos: Cruzamento Padrão (ST – *Standard cross*) e Cruzamento de Alta Bioativação Metabólica (HB – *High Bioactivation cross*). Para o primeiro, foram cruzadas fêmeas flr^3 com os machos mwh , e para o segundo foram cruzadas fêmeas $ORR; flr^3$ com machos mwh , sendo que o gene *ORR* é responsável pelo aumento na expressão de enzimas do complexo citocromo P450.

Ambos os cruzamentos (ST e HB) geram dois tipos de descendentes: indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH – $mwh+/+flr^3$), que apresentam asas com bordas lisas; e indivíduos heterozigotos-balanceados (BH – $mwh+/+TM3,Bd^s$), que apresentam asas com bordas serrilhadas. Nos indivíduos MH pode-se encontrar manchas do tipo “flare” e/ou “mwh”, dependendo de qual gene for alterado. Se a mancha tiver um ou dois pelos mutantes, de um mesmo tipo (mwh ou flare), é chamada de mancha simples pequena, se forem mais de dois pelos, é classificada como mancha simples grande. Além disso, há a possibilidade da formação de manchas gêmeas, oriundas da recombinação entre os genes “ flr^3 ” e “ mwh ”, apresentando os dois tipos de pelos em uma mesma região. Os indivíduos da progênie BH não podem expressar recombinação, pois possuem uma região de múltiplas inversões em seu

cromossomo 3, com isso, só apresentam manchas simples com pelos “mwh” (GRAF *et al.*, 1984).

Figura 6. Esquema representativo do Cruzamento Padrão (ST) e Cruzamento de Alta Bioativação (HB), e os indivíduos resultantes.



4.2.3. Tratamento

Larvas de 3º estágio ($72 \pm 4h$), obtidas de ambos os cruzamentos, foram tratadas por aproximadamente 48h com diferentes concentrações do PPX (0,0625; 0,125; 0,25 ou 0,5), que foram selecionadas para análise após a realização de um teste de sobrevivência, por permitirem eclosão igual ou superior a 60% de indivíduos tratados, até o 7º dia após o tratamento.

Tanto para o ensaio de sobrevivência, quanto para o SMART foram utilizados frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki Hiraki®) (de acordo com SPANÓ *et al.*, 2001), e foram adicionados 5 mL de cada concentração do PPX.

Após a hidratação do meio, as larvas de 3º estágio foram depositadas nos frascos. Uretano 10 mM e água ultrapura foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.2.4. Preparação e análise das lâminas

Os adultos, oriundos das larvas tratadas, foram coletados e mantidos em frascos com etanol 70%. Com o auxílio de pinças entomológicas e um estereomicroscópio as asas foram retiradas e alinhadas sobre uma lâmina de vidro, sendo que 5 pares de asas de fêmeas ficaram na parte superior da lâmina e 5 pares de asas de machos ficaram na parte inferior. Para aderir a lamínula à lâmina foram utilizados solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água) e pesos de metal. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, com aumento final de 400X.

4.2.5. Análise estatística

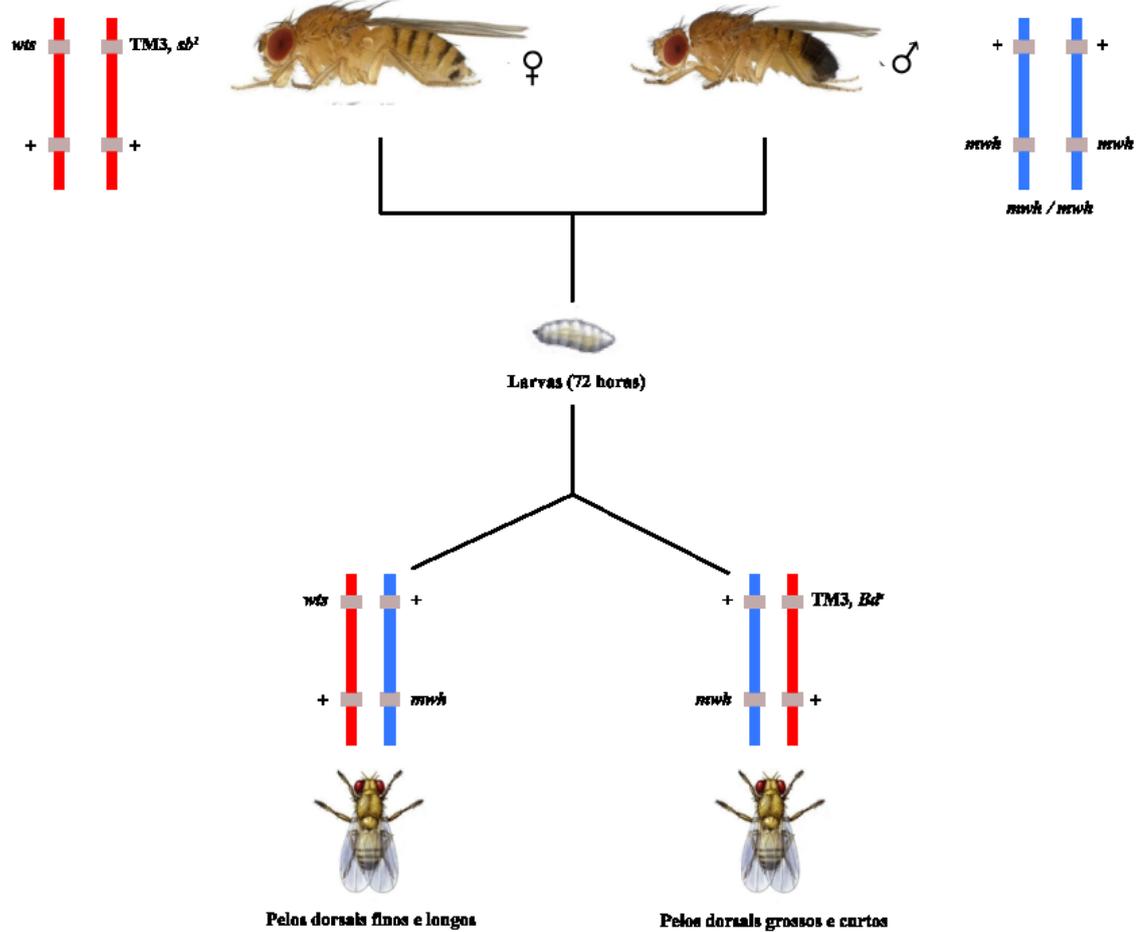
As frequências de manchas observadas nas moscas de cada série de tratamento foram comparadas com as frequências observadas no controle negativo. Para isso foi utilizado o teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), de acordo com o procedimento de decisões múltiplas de Frei e Würigler (1988). O teste do X^2 para proporções foi utilizado para comparar taxas de sobrevivência, com nível de significância: $\alpha=\beta=0,05$ de acordo com Frei e Würigler (1988).

4.3. Teste para a detecção de tumores epiteliais (ETT)

4.3.1. Linhagens e cruzamentos de *D. melanogaster*

Machos *mwh* (*mwh/mwh*) e fêmeas *wts* (*wts/TM3, sb¹*), foram cruzados para obter larvas *wts +/+ mwh* heterozigotas (Fig. 7). O gene balanceador “TM3, sb¹” é evidenciado nos indivíduos pelo aparecimento de pelos dorsais mais grossos e curtos.

Figura 7. Esquema representativo do Cruzamento realizado no teste ETT e os indivíduos resultantes.



4.3.2. Tratamento

O tratamento das larvas para ETT foi igual ao realizado para o SMART, sendo utilizado como controle positivo a doxorrubicina 0,4 mM. Foram utilizadas as concentrações definidas pelo ensaio de sobrevivência, utilizando-se os mesmos critérios utilizados para o SMART. Os indivíduos adultos emergentes do tratamento com larvas de 3º estágio (72 ± 4 h) foram coletados e armazenados em etanol 70%.

4.3.3. Análise das moscas

As moscas *wts* +/+ *mwh*, caracterizadas por apresentarem pelos selvagens (longos e finos), foram imersas em Glicerina ($C_3H_8O_3$), e com o auxílio de um estereomicroscópio, seus corpos foram analisados e os tumores contabilizados.

4.4. Análise estatística

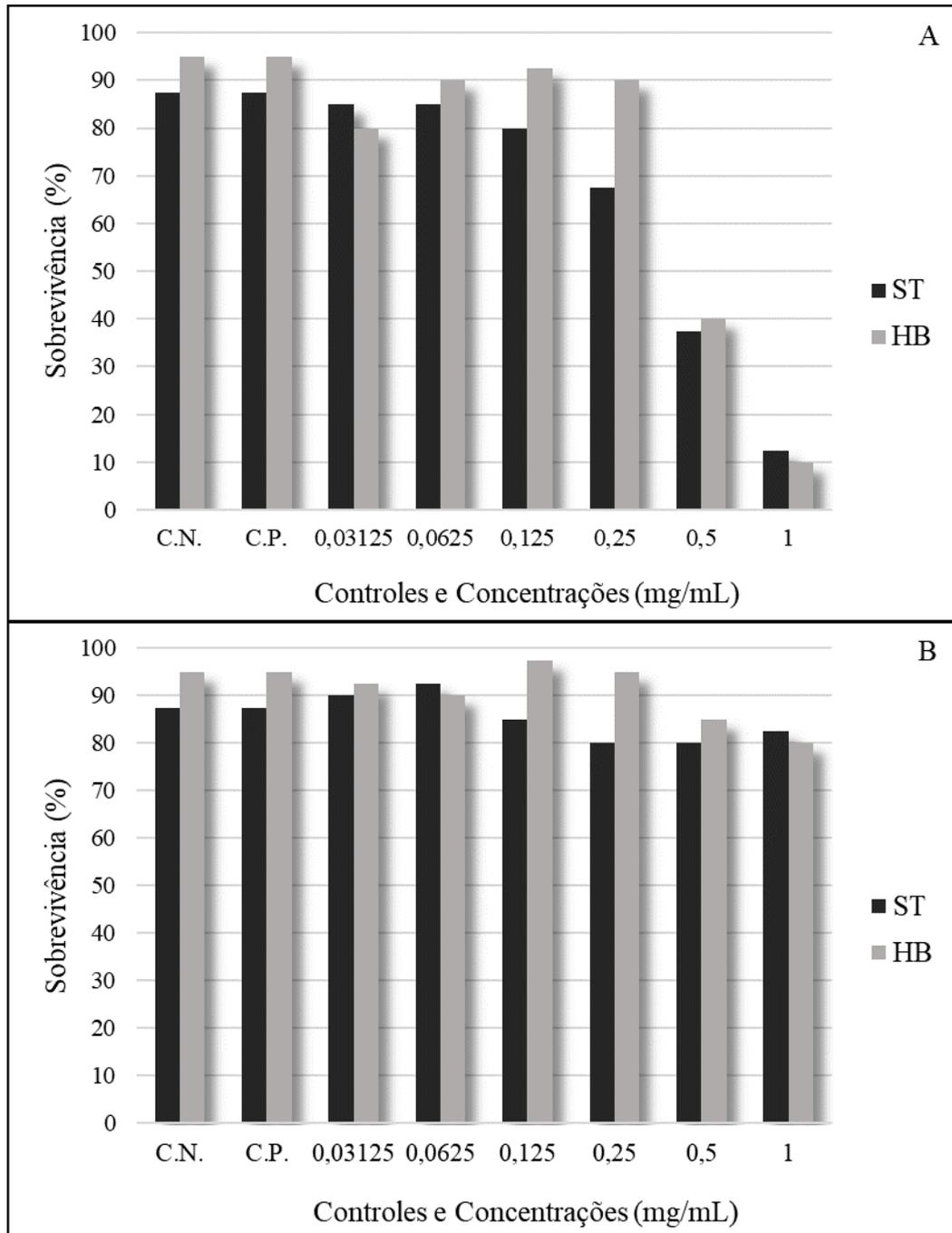
A frequência de tumores foi calculada pela razão entre o número de tumores e o número de indivíduos *wts +/+ mwh* analisados. Para o cálculo do potencial carcinogênico do PPX foi utilizado o Teste *U*, não-paramérico, desenvolvido por Mann, Whitney e Wilcoxon, usando um nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de sobrevivência

Um atraso no nascimento das moscas foi visualizado durante os testes de sobrevivência quando comparado com o controle negativo. Por isso, dois gráficos foram feitos, em dois diferentes momentos, para a melhor visualização desse fenômeno (**Figura 8A e B**). De acordo com os resultados, percebe-se que há um atraso de 3 dias para que todas as pupas existentes eclodissem, principalmente nas concentrações mais altas, visto que no 7º dia, as moscas do controle negativo já haviam eclodido e das maiores concentrações tratadas não. Apesar do atraso, no fim do último dia de coleta, o PPX não se mostrou tóxico em nenhuma das concentrações, uma vez que não diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência ($p < 0,05$) em nenhum dos cruzamentos quando comparados com os respectivos controles negativos. Em estudos de toxicidade aguda realizados em ratos, camundongos e cachorros pelo fabricante (Boehringer Ingelheim), a DL50 (Dose letal mediana) se mostrou relativamente alta (HEALT CANADA, 2019).

Figura 8. Taxa de sobrevivência dos indivíduos dos cruzamentos ST e HB, tratados em diferentes concentrações e contabilizados em dias distintos, sendo (A) 7º dia após tratamento e (B) 10º dia após tratamento.



5.2. Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

Diante dos resultados obtidos no Teste de Sobrevivência, as concentrações escolhidas para análise foram: 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/mL. Os resultados das análises dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) estão representados nas Tabelas 1 e 2.

As frequências de mutações observadas no controle negativo (água ultrapura) e controle positivo (uretano 10 mM), para ambos os cruzamentos, estão de acordo com resultados de experimentos prévios com o SMART (NAVES *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2018).

A análise dos indivíduos MH do Cruzamento ST (**Tabela 1**) permite concluir que o PPX não induziu aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na frequência de manchas mutantes, quando comparado com o controle negativo. O mesmo resultado foi observado na análise dos descendentes MH do Cruzamento HB (**Tabela 2**). Uma vez que o PPX não induziu aumento na frequência de manchas mutantes nos indivíduos MH, quando comparado ao controle negativo, não foi necessário a análise dos descendentes heterozigotos balanceados (BH).

Portanto, não há interferência das enzimas do complexo enzimático citocromo P450 na formação de manchas induzidas pelo PPX. Isto pode ser devido ao fato de o PPX não ser metabolizado por essas enzimas, ou por inibi-las, como acontece com a enzima CYP2D6 quando atinge um K_i aparente de 30 μm (FDA, 2005¹). Apesar dessa concentração não ser atingida no uso da dose clínica mais alta recomendada em humanos, não é conhecido esse efeito na *D. melanogaster*. Apesar da não responsividade das enzimas do citocromo P450, o PPX apresentou genotoxicidade e citotoxicidade em diferentes estudos farmacológicos que utilizaram outras enzimas (FDA, 2005³; 2005²).

Em teste de clastogenicidade realizado em cultura de células de ovário de Hamster Chinês, com e sem a ativação de frações S9, foi observado aumento estatisticamente significativo na frequência de aberrações cromossômicas nas células tratadas com a maior concentração de PPX (3300 $\mu\text{g/mL}$), na presença das enzimas S9. Nesse mesmo teste, o PPX causou citotoxicidade, estatisticamente significativa, nas concentrações mais altas (FDA, 2005²). A fração S9 é um preparado de microsomas de mamíferos, geralmente extraído de fígado de roedores, que contém enzimas do complexo citocromo P450 e outras enzimas citosólicas, usada para avaliação de genotoxicidade de agentes químicos após metabolização (HUBBARD *et al.*, 1985).

Em outro ensaio, dessa vez de mutagenicidade para o gene *HGPRT*, o PPX não gerou mutações no locus *HGPRT* na linhagem celular V79 de Hamster chinês, porém, citotoxicidade significativa nas concentrações de 5000 µg/mL (FDA, 2005³).

O FDA (2005⁴) também fez testes não-clínicos nos produtos da degradação do PPX, que foram designados de BIII 786, BII 820, Produto V, e Produtos Z₁ e Z₂ (Produtos de fotodegradação). A mutagenicidade do BII 786 foi testada por meio do teste de Ames padrão, em concentrações de 100-7000 µg/placa, na ausência ou presença de fração S9 de hamster e rato. Os resultados indicam a falta de resposta mutagênica no grupo tratado sem as enzimas S9, e uma resposta positiva da linhagem TA98 (o dobro da frequência de mutação do que o controle) sob a presença de S9 de ambas as derivações. Os outros produtos não apresentaram genotoxicidade ou citotoxicidade, porém uma linhagem sensível a mutações A-T não foi utilizada (*S. typhimurium* TA102 ou *E. coli* WP2 uvrA) em nenhum dos testes.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de Dicloridrato de Pramipexol (PPX), controle positivo (uretano 10 mM) e controle negativo (água ultrapura).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. Estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	
<i>mwh/flr3</i>						
Contr. Neg.	50	0,52 (26)	0,02 (01)	0,04 (02)	0,58 (29)	28
Contr. Pos.	40	2,10 (84) +	0,15 (06) +	0,00 (00) i	2,25 (90) +	84
PPX						
0,0625	40	0,43 (17) -	0,05 (02) i	0,00 (00) i	0,48 (19) -	18
0,125	40	0,43 (17) -	0,10 (04) i	0,05 (02) i	0,58 (23) -	21
0,25	40	0,53 (21) -	0,10 (04) i	0,03 (01) i	0,65 (26) -	24
0,5	40	0,53 (21) -	0,05 (02) i	0,03 (01) i	0,60 (24) -	23

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^b Incluindo manchas simples *flr3* raras.

^c Considerando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com diferentes concentrações de Dicloridrato de Pramipexol, controle positivo (uretano 10 mM) e controle negativo (água ultrapura).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (nº. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Contr. Neg.	60	0,62 (37)	0,18 (11)	0,07 (04)	0,87 (52)	48
Contr. Pos.	60	10,98 (659)	1,22 (73)	1,55 (93)	13,50 (810)	742
PPX						
0,0625	60	0,73 (44) -	0,08 (05) -	0,07 (04) -	0,88 (53) -	52
0,125	60	0,68 (41) -	0,10 (06) -	0,03 (02) i	0,82 (49) -	48
0,25	60	0,72 (43) -	0,08 (05) -	0,00 (00) -	0,80 (48) -	46
0,5	60	0,85 (51) i	0,15 (09) -	0,05 (03) i	1,05 (63) -	57

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância *a* = *b* = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

5.3. Teste para a detecção de tumores epiteliais (ETT)

O potencial carcinogênico do PPX foi avaliado por meio do *Ephitelial Tumor Test* (ETT), que permite a visualização de tumores epiteliais, induzidos por agentes carcinogênicos em *D. melanogaster* (MORAIS *et al.*, 2018; NAVES *et al.*, 2018). O teste baseia-se na perda da função do gene *wts*, um supressor tumoral, ligado ao controle do ciclo celular, e da proliferação e formato celulares. A recombinação mitótica pode induzir a perda de homozigose do gene *wts* em células somáticas originárias dos discos imaginais da *D. melanogaster*, levando à formação de clones celulares fragmentados, redondos e grandes, nas estruturas adultas após a metamorfose (JUSTICE *et al.*, 1995; NEPOMUCENO, 2015).

No presente estudo, o PPX aumentou de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o número total de tumores epiteliais, quando comparado ao controle negativo, sendo que a maioria dos tumores foi encontrada no corpo da mosca (**Tabela 3**). Sabe-se que em comparação com o SMART, no ETT é mais fácil de serem encontradas alterações em concentrações mais baixas, pois ele possui maior sensibilidade, visto que os tumores epiteliais podem ser encontrados em todo o corpo do indivíduo adulto, como na cabeça, olhos, pernas e asas (EEKEN *et al.*, 2002, NAVES *et al.*, 2018).

Ensaio conduzidos em ratos Wistar (Chbb: THOM) mostraram um aumento na incidência de adenomas e hiperplasia nas células de Leydig nos grupos de dosagem média (DM) (2 mg/kg/dia) e de dosagem alta (DA) (8 mg/kg/dia) em ratos machos. Alterações não-neoplásicas também foram visualizadas, como o aumento do corpo lúteo em ratos de DA, lesões e hemorragia uterina (DM e DA), alterações nos padrões de glândulas mamárias (DM e DA), mudanças difusas na gordura hepatocelular (DM e DA) e degeneração retinal ocorreram em grupos de DM e DA de ambos os sexos (FDA⁵; FDA⁶).

O mesmo estudo avaliou camundongos (Chbb: NMRI) e poucas lesões neoplásicas e não neoplásicas foram associadas ao PPX. Porém, foram observadas tendências dose-dependentes de neoplasmas mesenquimais/epiteliais uterinos, duplicação da incidência de lesões fibro-ósseas proliferativas no fêmur de fêmeas em todos os grupos tratados com PPX; tendência de aumento de pólipos no estroma uterino nos grupos tratados com as maiores doses; e aumento da incidência de sarcomas histocísticos em machos. Apesar disso, o estudo não pôde ser aceito como um ensaio válido do potencial carcinogênico do PPX, devido à alta imparidade do peso corporal que interfere com a interpretação dos dados em ambas as doses média e alta, já que isso torna difícil definir se a quantidade não expressiva de tumores é causada pelo fármaco ou pelo menor desenvolvimento dos animais. A curva resposta para redução de ganho de peso nos camundongos sob uso de PPX é muito drástica: na semana 74

há diferença de 49 e 53% (machos e fêmeas, respectivamente) no ganho de peso dos grupos DA e DM quando comparados com o controle negativo, na semana 102 a diferença ainda era 39 e 45%. Houve também, uma tendência de mortalidade/dose em camundongos machos, mas não em fêmeas (FDA⁵; FDA⁷).

Os carcinógenos podem ser classificados entre genotóxicos e não-genotóxicos. O primeiro interage diretamente com o DNA, tanto na sua composição original quanto seus metabólitos; enquanto que o segundo produz atividades carcinogênicas alterando o fenótipo celular sem alterar o genótipo básico do DNA (BENIGNI *et al.*, 2013). Para induzir esse dano, os carcinógenos não-genotóxicos podem promover mecanismos como: promoção de tumor, alteração endócrina, estresse oxidativo, inflamação crônica, mecanismos epigenéticos, como hiper ou hipometilação do DNA; e toxicidade tecido-específica (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; JACOBS *et al.*, 2016).

A indução de citotoxicidade, a imuno-modulação e indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser eventos cruciais para indução de câncer por carcinógenos não-genotóxicos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

Como citado anteriormente, o PPX apresentou citotoxicidade em testes realizados pelo FDA (2005² e 2005³), indicou atividade moduladora do sistema imune e reestabeleceu a produção de EROs em estudo conduzido por LIEBERKNECHT e colaboradores (2016). Apesar disso, a detecção de carcinógenos não-genotóxicos é muito difícil devido à diversidade de mecanismos de ação, a especificidade de tecidos e espécie, e a falta de genotoxicidade (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Diante dos dados da literatura, sugere-se que há três possibilidades que permitem a elucidação do porquê o PPX se mostrou, nas condições do presente estudo, carcinogênico porém não mutagênico: o teste ETT é mais sensível e apresenta alterações mais facilmente, o que justificaria o maior número de ocorrências no teste ETT do que no SMART; a outra hipótese é que os metabólitos do PPX são genotóxicos mas esse efeito não pode ser visualizado no teste SMART com o cruzamento HB, pois o composto não é metabolizado por enzimas do complexo citocromo P450, e pode ter até mesmo um potencial inibidor; e, por fim, a terceira possibilidade é que o PPX seja um carcinógeno não-genotóxico, que induz aumento no número de tumores pela alteração no gene *wts* de forma indireta, seja por citotoxicidade, imuno-modulação ou produção de EROs.

Tabela 3. Frequência de clones de tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* em *Drosophila melanogaster*, tratadas com diferentes concentrações de Dicloridrato de Pramipexol (PPX), controle positivo (doxorubicina 0,4 mM) e controle negativo (água ultrapura).

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Frequência de tumor analisados (total de tumor)						
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halters	Total
<i>wts/mwh</i>								
Contr. Neg.	200	0,015 (03)	0,025 (05)	0,025 (05)	0,265 (53)	0,020 (04)	0,000 (00)	0,350 (70)
Contr. Pos.	171	0,508 (87)*	0,152 (26)*	0,929 (159)*	0,830 (142)*	0,508 (87)*	0,140 (24)*	3,070 (525)*
PPX								
0,0625	200	0,035 (07)	0,045 (09)	0,075 (15)*	0,295 (59)	0,030 (06)	0,020 (04)	0,500(100)*
0,125	200	0,015 (03)	0,055 (11)*	0,035 (07)	0,355 (71)*	0,025 (05)	0,010 (02)	0,500 (100)*
0,25	200	0,025 (05)	0,040 (08)	0,040 (08)	0,360 (72)*	0,030 (06)	0,010 (02)	0,505 (101)*
0,5	200	0,025 (05)	0,045 (09)	0,045 (09)	0,320 (64)*	0,085 (17)*	0,005 (01)	0,525 (105)*

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Nível de significância ($p \leq 0,05$).

* Valores considerados estatisticamente diferentes do controle negativo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais utilizadas no presente trabalho, conclui-se que o PPX não possui efeitos mutagênicos ou recombinogênicos em células de asas de *Drosophila melanogaster*, porém, apresentou efeitos carcinogênicos, induzindo de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) alta frequência de tumores epiteliais.

Diante da importância do emprego do PPX no tratamento da DP, assim como no de outras doenças psiquiátricas, são necessários mais estudos que elucidem a relação do PPX com mecanismos genéticos, epigenéticos, citotóxicos e imunes, a fim de determinar a segurança do uso clínico deste fármaco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSLAND, D.; ANDERSEN, K.; LARSEN, J. P.; LOLK, A.; NIELSEN, H.; KRAGH-SØRENSEN, P. Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. **Neurology**, v. 56, p. 730-36, 2001.

AARSLAND, D.; BRØNNICK, K.; EHRT, U.; DE DEYN, P. P.; TEKIN, S.; EMRE, M.; CUMMINGS, J. L. Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated care giver stress. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 78, p. 36-42, 2007.

ALEXANDER, G. E. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 259-80, 2004.

ALTHAUS, A.; BECKER, O. A.; SPOTTKE, A.; DENGLERE, R.; SCHNEIDER, F.; KLOSS, M.; EGGERT, K.; OERTE, W. H.; H. DILLMANN, U.; HERTING, B.; CLASSEN, J.; DODELA, R. Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 14, n. 8, p. 626-32, 2008.

ANTONINI, A.; BARONE, P.; CERAVOLO, R.; FABBRINI, G.; TINAZZI, M.; ABBRUZZESE, G. Role of pramipexole in the management of Parkinson's disease. **CNS Drugs**, v. 24, n. 10, p. 829-41, 2010.

ANTONINI, A.; ABBRUZZESE, G.; BARONE, P.; BONUCCELLI, U., LOPIANO, L., ONOFRJ, M., ZAPPIA, M., QUATTRONE, A. COMT inhibition with tolcapone in the treatment algorithm of patients with Parkinson's disease (PD): relevance for motor and non-motor features. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2008.

ASHBURNER, M.; GOLIC, K; HAWLEY, R. S. **Drosophila: A Laboratory Handbook**. 2.ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.211–212, 2011.

BERTONI, J. M. Increased Melanoma Risk in Parkinson Disease: A Prospective Clinicopathological Study. **Archives of Neurology**, v. 97, n. 3, p. 347-52, 2010.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease, **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, p. 387-410, 2014.

BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. [Editorial]. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 3, p. vii-ix, jul./sept., 2016.

BROOKS, D. J. Dopamine agonists: their role in the treatment of Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 68, n. 6, p. 685-9, 2000.

BURN, D. Parkinson's disease: treatment. Parkinson's disease: treatment. **The Pharmaceutical Journal**, v. 264, n. 7089, p. 476-9, 2000

CASTRO-HERNÁNDEZ, J.; AFONSO-ORAMAS, D.; CRUZ-MUROS, I.; SALAS-HERNÁNDEZ, J.; BARROSO-CHINEA, P.; MORATALLA, R.; MILLAN, M. J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. Prolonged treatment with pramipexole promotes physical interaction of striatal dopamine D3 autoreceptors with dopamine transporters to reduce dopamine uptake. **Neurobiology of Disease**, v. 74, p. 325-35, 2015.

CENCI, M. A. Presynaptic Mechanisms of 1-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. **Frontiers in Neurology**, v. 5, n. 242, p. 1-15, 2014.

CHIFIRIUC, M.; CRISTIAN, R.; POPA, M.; ECOVOIU, A. Drosophotoxicology: An Emerging Research Area for Assessing Nanoparticles Interaction with Living Organisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 36, p. 1-14, 2016

CHWIEDUK, C. M.; CURRAN, M. P. Pramipexole extended release: in Parkinson's disease. **CNS Drugs**, v. 24, n. 4, p. 327-36, 2010.

CHYB, S.; GOMPEL, N. Wild-type morphology. In: CHYB, S.; GOMPEL, N, G. *Atlas of Drosophila Morphology: Wild-type and Classical Mutants*. Elsevier: Academic Press, 2013. p. 1-23.

CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C.; ZUARDI, A. W.; GUIMARÃES, F. S.; TUMAS, V.; SANTOS, R. G. Is cannabidiol the ideal drug to treat non-motor Parkinson's disease symptoms? **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 269, n. 1, p. 121-33, 2019.

CENTER FOR STRATEGIC & INTERNATIONAL STUDIES. **Global aging initiative**. Washington, DC: Center for Strategic and International Studies, 2011. Disponível em: <https://www.csis.org/programs/former-programs/global-aging-initiative>. Acesso em: 03/10/2019

DAUER, W.; PRZERDBORSKI, S. Parkinson's Disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DUNLOP, B. W.; NEMEROFF, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, p. 327-37, 2007.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R., THOMPSON, J. P., BIGLAN, K. M., HOLLOWAY, R. G., KIEBURTZ, K. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384-86, 2007.

FARHA, K. A.; BALJÉ-VOLKERS, C.; TAMMINGA, W.; DEN DAAS, I.; VAN OS, S. Dopamine D2R Agonist-Induced Cardiovascular Effects in Healthy Male Subjects: Potential Implications in Clinical Settings. **ISRN Neurology**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

FAWCETT, J.; RUSH, A. J.; VUKELICH, J.; DIAZ, S. H.; DUNKLEE, L.; ROMO, P.; YARNS, B. C.; ESCALONA, R. Clinical Experience With High-Dosage Pramipexole in Patients With Treatment-Resistant Depressive Episodes in Unipolar and Bipolar Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 2, 107-11, 2016.

¹FDA. Office of Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review, 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_clinpharm.pdf. Acesso em: 26/09/2019.

²FDA. Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Chinese Hamster Ovary Cells, 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_pharmr_P5.pdf. Acesso em: 26/09/19.

³FDA. V79 Gene Mutation Assay for HGPRT Mutants, 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_pharmr_P5.pdf. Acesso em: 26/09/19.

⁴FDA. Divisio of Neuropharmacological Drug Products Review ans Evaluation of Pharmacology & Toxicology Data – Amendment 015, 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_pharmr_P9.pdf. Acesso em: 30/09/2019.

⁵FDA. Carcinogenicity Assessment Committee (CAC/CAC-EC) Report, 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_pharmr_P1.pdf. Acesso em: 01/10/2019.

⁶FDA. Carcinogenicity – Two-Year Rat Carcinogenicity Study, 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_pharmr_P6.pdf. Acesso em: 01/10/2019.

⁷FDA. Carcinogenicity – Two-year Mouse Carcinogenicity Study. 1 de julho de 2005. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/020667a_pharmr_P5.pdf. Acesso em: 01/10/2019.

FERREIRA, J. J.; NEUTEL, D.; MESTRE, T.; COELHO, M.; ROSA, M. M.; RASCOL, O., SAMPAIO, C. Skin Cancer and Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 25, n. 2, p. 139-148, 2010.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. **ALTEX**, v. 19, n. 2, p. 73-8, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA Drug Safety Communication: Ongoing safety review of Parkinson's drug Mirapex (pramipexole) and possible risk of heart failure. Disponível em: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm319779.htm>. Acesso em: 22/04/2019.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 334, p. 247-258, 1995.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.

GARCIA-BELLIDO, A.; RIPOLL, P.; MORATA, G., Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. **Developmental Biology**, v. 48, p.132–147, 1976.

GAO, G.; CHEN, R.; HE, M.; LI, J.; LI, J.; WANG, L.; SUN, T. Gold nanoclusters for Parkinson's disease treatment. **Biomaterials**, v. 194, p. 36-46, 2019.

GEORGE, J. L.; MOK, S.; MOSES, D.; WILKINS, S.; BUSH, A. I.; CHERNY, R. A.; FINKELSTEIN, D. I. Targeting the progression of Parkinson's disease. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 9-36, 2009.

GOETZ, C. G.; PAL, G. Initial management of Parkinson's disease. **BMJ**, v. 349, p. 1-11, 2010.

GRAF, U., SPANÓ, M. A.; GUZMÁN RINCÓN, J.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**, v. 6, n. 1, p. 9-13, 1996.

GRAF, U., WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153-88, 1984.

GUTTMAN, M.; STEWART, D.; HUSSEY, D.; WILSON, A.; HOULE, S.; KISH, S. Influence of L-dopa and pramipexole on striatal dopamine transporter in early PD. **Neurology**, v. 56, n. 11, p. 1559-64, 2001.

HEALTH CANADA. Product Monograph for Mirapex (Pramipexole Dihydrochloride) Tablets, 2 de janeiro de 2019. Disponível em: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00049070.PDF. Acesso em: 29/04/2019.

HERNÁNDEZ, L. G.; VAN STEEG, H.; LUIJTEN, M.; VAN BENTHEM, J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 2-3, p. 94–109, 2009.

HUBBARD, S. A.; BROOKS, T. M.; GONZALEZ, L. P., BRIDGES, J.W. Preparation and Characterisation of S9 Fractions. In: PARRY, J. M.; ARLETT, C. F. (Eds) Comparative Genetic Toxicology. London: Palgrave Macmillan, 1985. p. 413-438.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368-446, 2008.

JUSTICE, R. W., ZILIAN, O.; WOODS, D. F; NOLL, M.; BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of the cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, p. 534-546, 1995.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527-549, 1970.

KORCZYN, A. D. Drug treatment of Parkinson's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 315-22, 2004.

KRISHNA, R.; ALI, M.; MOUSTAFA, A. A. Effects of combined MAO-B inhibitors and levodopa vs. monotherapy in Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. 180, p. 1-9, 2014.

LAU, L. M; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525-35, 2006.

LIEBERKNECHT, V.; JUNQUEIRA, S. C.; CUNHA, M. P.; BARBOSA, T. A.; DE SOUZA, L. F.; COELHO, I. S.; & SANTOS A. R. S.; RODRIGUES A. L. S.; DAFRÉ A. L.; DUTRA, R. C. Pramipexole, a Dopamine D2/D3 Receptor-Preferring Agonist, Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development in Mice. **Molecular Neurobiology**, v.54, n. 2, p. 1033–1045, 2016.

MANDEL, S. A.; MORELLI, M.; HALPERIN, I.; KORCZYN, A. D. Biomarkers for prediction and targeted prevention of Alzheimer's and Parkinson's diseases: evaluation of drug clinical efficacy. **EPMA Journal**, v. 1, n. 2, p. 273-92, 2010.

MONTEIRO, Danielle. “Fundação iniciará a distribuição do pramipexol para SUS”. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/fundação-iniciará-a-distribuição-do-pramipexol-para-o-sus>. Acesso em: 22/04/2019.

MORAIS, C. R., BONETTI, A. M.; MOTA, A. A.; CAMPOS, C. F.; SOUTO, H. N.; NAVES, M. P. C.; VIEIRA SANTOS, V. S.; JÚNIOR, E. O. C., PAVANIN, L. A.; ALVES DE REZENDE, A. A.; SPANÓ, M. A.; PEREIRA, B. B. Evaluation of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of samples from domestic and industrial sewage. **Chemosphere**, v. 201, p. 342-350, 2018.

NAVES, M. P. C., DE MORAIS, C. R.; SILVA, A. C. A.; DANTAS, N. O.; SPANÓ, M. A.; DE REZENDE, A. A. A. Assessment of mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potencial of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 273-281, 2018.

NISHIYAMA, Y., HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IIDA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, v. 459, p. 159-165, 1999.

O'CONNOR, K. Strange Side Effects Surprise Patients [15 de julho, 2015]. Nova Iorque: ABC NEWS Medical Unit. Entrevista concedida a Allyson T. Collins.

PARKINSON STUDY GROUP. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 284, p. 1931-8, 2000.

POEWE, W.; RASCOL, O.; BARONE, P.; HAUSER, R. A.; MIZUNO, Y., HAAKSMA, M., SALIN, L.; JUHEL, N., SCHAPIRA, A. H.; Pramipexole ER Studies Group. Extended-release pramipexole in early Parkinson disease: a 33-week randomized controlled trial. **Neurology**, v. 77, n. 8, p. 759-66, 2011.

POTTER, C. J.; TURENCHALK, G. S.; XU, T. *Drosophila* in cancer research, an expanding role. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 33-9, 2000

MIRAPEX. Alemanha: Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 1997. Bula de remédio.

MIYASAKI, J. M; AL HASSAN, K.; LANG, A. E., VOON, V. Punding prevalence in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 22, n. 8, p. 1179-81, 2007.

MONTPLAISIR, J., DENESLE, R., PETIT, D. Pramipexole in the treatment of restless legs syndrome: a follow-up study. **European Journal of Neurology**, v. 7, p. 27– 31, 2000.

PALMITER, R.D. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? **Trends Neuroscience**, v. 30, p. 375-81, 2007.

PIERCEY, M. F. Pharmacology of pramipexole, a dopamine D3-preferring agonist useful in treating Parkinson's disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 21, n. 3, p. 141–51, 1998.

PIERCEY, M. F.; HOFFMANN, W. E; SMITH, M. W; HYSLOP, D. K. Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D3 receptor preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 312, n. 1, p. 35-44, 1996.

PONTONE, G. M.; BAKKER, C. C.; CHEN, S.; MARI, Z.; MARSH, L.; RABINS, P. V; WILLIAMS, J. R.; BASSETT, S. S. The longitudinal impact of depression on disability in Parkinson disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 31, p. 458–65, 2016.

RECH, M. P. **Experimentação Animal: Uma abordagem acerca do sofrimento e crueldade**, 2013. 33f. Monografia (Bacharel em Ciências Jurídicas e Sociais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

REITER, L.T.; POTOCKI, L.; CHIEN, S.; GRIBSKOV, M.; BIER, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, v. 11, p. 1114-25, 2001.

ROBERTS, D. B. *Drosophila melanogaster*: the model organismo. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, p. 93-103, 2006.

ROBERTS-WARRIOR, D.; OVERBY, A.; JANKOVIC, J.; OLSON, S.; LAI, E. C.; KRAUSS, J. K.; GROSSMAN, R. Postural control in Parkinson's disease after unilateral posteroventral pallidotomy. **Brain**, v. 123, n. 10, p. 2141-9, 2000.

RUSSELL, J. M.; HAWKINS, K.; OZMINKOWSKI, R. J; ORSINI, L., CROWN, W. H.; KENNEDY, S.; FINKELSTEIN, S.; BERNDT, E.; RUSH, A. J. The cost consequences of treatment-resistant depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 65, n. 3, p. 341-7, 2004.

SANTOS-GARCÍA, D.; DE LA FUENTE-FERNÁNDEZ, R. Factors contributing to caregivers' stress and burden in Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 131, p. 203–10, 2015.

SCHILLING, J. C.; ADAMUS, W. S.; PALLUCK, R. Neuroendocrine and side effect profile of pramipexole, a new dopamine receptor agonist, in humans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 51, n. 5, p. 541-8, 1992.

SHALABY, S. Y.; LOUIS, E. D. Increased Odds of Melanoma: Parkinson's Disease, Essential Tremor, Dystonia versus Controls. **Neuroepidemiology**, v. 46, p. 128-36, 2016.

SHANNON, K. M. Efficacy of pramipexole, a novel dopamine agonist, as monotherapy in mild to moderate Parkinson's disease. **Neurology**, v. 49, n. 3, p. 724-8, 1997.

SMITH, K. M.; EYAL, E.; WEINTRAUB, D. Combined rasagiline and antidepressant use in Parkinson disease in the ADAGIO study: effects on nonmotor symptoms and tolerability. **JAMA Neurology**, v. 72, p. 88-95, 2015.

SILINDIR, M.; OZER, A. Y. The benefits of pramipexole selection in the treatment of Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 1505-11, 2014.

STAATS, S.; LÜERSEN, K.; WAGNER, A. E.; RIMBACH, G. *Drosophila melanogaster* as a Versatile Model Organism in Food and Nutrition Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 15, p. 3737-3753, 2018.

SWINN, L.; SCHRAG, A.; VISWANATHAN, R.; BLOEM, B. R.; LEES, A., QUINN, N. Sweating dysfunction in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 18, n. 12, p. 1459-63, 2003.

TINTNER, R.; JANKOVIC, J. Dopamine agonists in Parkinson's disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 12, n. 11, p. 1803-20, 2003.

TYNES, O. B.; STORSTEIN A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901-05, 2017.

VAN UEM, J. M.; MARINUS, J.; CANNING, C.; VAN LUMMEL, R., DODEL, R.; LIEPELT-SCARFONE, I., BERG, D.; MORRIS, M. E.; MAETZLER, W. Health-related quality of life in patients with Parkinson's disease—a systematic review based on the ICF model. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 61, p. 26–34, 2016.

WALTERS, A. S. Toward a better definition of restless legs syndrome: The International Restless Legs Syndrome Study Group. **Movement Disorders**, v. 10, p. 634–42. 1995.

WEINTRAUB, D; BURN, D. J. Parkinson's disease: the quintessential neuropsychiatric disorder. **Movement Disorders**, v. 26, p. 1022–31, 2011.

WEINTRAUB, D.; SIDEROWF, A. D.; POTENZA, M. N; GOVEAS, J.; MORALES, K. H.; DUDA, J. E; MOBERG, P. J.; STERN, M. B. Association of dopamine agonist use with impulse control disorders in Parkinson disease. **Archives of neurology**, v. 63, n.7, p. 969-73, 2006.

WILLNER, P.; HALE, A. S.; ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 86, n. 1, p. 37-45, 2005.