

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA DORIEUX WASTNER CUNHA

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESTRIÇÃO CRÔNICA DE
SONO TOTAL E O DESEMPENHO NO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO
OLFATÓRIA EM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA
EM RATOS

CURITIBA

2019

FLÁVIA DORIEUX WASTNER CUNHA

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESTRIÇÃO CRÔNICA DE
SONO TOTAL E O DESEMPENHO NO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO
OLFATÓRIA EM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA
EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia, no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima.

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva


ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FISILOGIA.

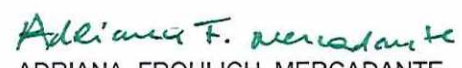
No dia vinte e seis de agosto de dois mil e dezenove às 09:00 horas, na sala 103, Auditório do departamento de Fisiologia da UFPR do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa da dissertação da mestrand **FLÁVIA DORIEUX WASTNER CUNHA**, intitulada : **"INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESTRIÇÃO CRÔNICA DE SONO TOTAL E O DESEMPENHO NO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA EM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS"**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná em FISILOGIA foi constituída pelos seguintes Membros: MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ADRIANA FROHLICH MERCADANTE (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA), LUANA FISCHER (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora que decidiu pela aprovação. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga do título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada à sessão, da qual eu, MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Observações: _____

Curitiba, 26 de Agosto de 2019.


MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Presidente da Banca Examinadora


LUANA FISCHER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)


ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
BÁSICA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001016072P4

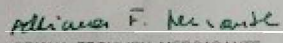
TERMO DE APROVAÇÃO

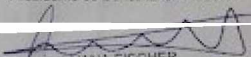
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FLÁVIA DORIEUX WASTNER CUNHA**, intitulada: "INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESTRIÇÃO CRÔNICA DE SONO TOTAL E O DESEMPENHO NO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA EM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS", sob orientação do Prof. Dr. **MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA**, após terem inquirido a autora e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e condições solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demais regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Agosto de 2019.


MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Presidente da Banca Examinadora


ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
BÁSICA)


LUANA FISCHER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha família, Vânia, Sérgio e Paula, pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos. Obrigada por sempre me incentivarem e serem o meu porto seguro. Vocês acordaram comigo 05:30 da manhã nos dias de privação (que não foram poucos), me deram carona para o politécnico, aguentaram meus choros e ficaram sem dormir direito, enquanto eu virava noites envolvida com as tarefas do mestrado. Não tenho palavras para descrever a sorte que tenho em ter vocês como minha família, sem a força de vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima, agradeço por toda essa jornada juntos, por ter me aceito como sua aluna, e por todo o apoio e conselhos para chegar até aqui. Você é uma inspiração profissional e manifesto aqui a minha gratidão eterna por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e a sua experiência.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Lais, Adriano, Jéssica, Patrícia e Ju. Obrigada pela amizade, pelas risadas e pelos rolês no natalidade, churrascos e viagens congressais. Je, muito obrigada por me receber na sua casa, por tentar ser hacker comigo haha, por me defender na saída dos shows, pelos sufocos que já passamos juntas, e por estender a mão num momento que eu precisava de ajuda. Lais, obrigada pelas orientações, por sempre estar disposta a ajudar e responder minhas dúvidas via whats ou por topar me ajudar 6 horas da manhã. Furamos a tradição da comemoração aniversarial arianas desse ano, mas ano que vem já quero uma comemoração juntas (eu, você e a Je). Estou com saudades dos seus mimis e dos churrascos com coraçãozinho. Patsy, agradeço por ouvir meus desabafos, pelos conselhos e por ser a melhor professora de perfusão que existe, além de ser a minha Alci preferida, com certeza não existe melhor performance. Adriano, pra sempre nossa Bey, obrigada pelas caronas, por ceder o final da musica Ariranha para mim (

Aos alunos de iniciação científica: Fabi, Jaque, Jéssica, Clara e Daniel. Obrigada por toda ajuda nos experimentos, pela disponibilidade e pela motivação. Vocês foram muito importantes. Fabi, obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, e por se preocupar comigo em ficar tantos dias seguidos na privação.

Às minhas amigas desde o colégio, Mah, Je, Mila, pelos mais de 12 anos de amizade, pelos nossos diferentes objetivos não ter nos afastado e por todos os jantarzinhos e festas que fomos juntas. É muito bom ter com quem relembrar as histórias da infância. Kely, você acompanhou minha trajetória desde o cursinho e na escolha do curso de biomedicina, e agora está presente em mais essa conquista, agradeço também pela compreensão com minhas ausências devido aos estudos, provas, e agora pelos experimentos. Josi, agradeço por ser um ótimo ouvinte e conselheiro, sempre me dando forças e me incentivando a não desistir dos meus sonhos. Aos meus colegas biomédicos germânicos pelas palavras de apoio e cumplicidade: Ana, Luana, Baldi, Giuli, Xavi, Hakemi, Marina.

Meus amigos do intercâmbio: Bia, Nayara, Agnes, Eduardo, Thiago, Renan. Vocês me mostraram que uma amizade verdadeira transpassa barreiras e que os anos só provam que o sentimento que temos uns pelos outros continua o mesmo. Precisamos planejar o reencontro do segundo semestre para cantarmos a nossa música no karaokê.

Agradeço, ainda, à Universidade Federal do Paraná, por ter sido minha segunda casa por tantos anos, é uma instituição a qual eu sempre vou me orgulhar em ter feito parte da minha história. Aos professores do departamento de Fisiologia, por fazerem parte da minha formação.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro para que esse projeto fosse concretizado.

RESUMO

A doença de Parkinson caracteriza-se pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* e pela presença de corpúsculos de Lewy. Possui um período pré-clínico, prodromico, caracterizado por distúrbios do sono (sonolência diurna excessiva, insônia, distúrbio do sono REM) e distúrbios olfatórios (hiposmia) que antecedem em até 20 anos o aparecimento dos sintomas motores característicos da doença. Os mecanismos envolvidos nestas manifestações clínicas não estão completamente elucidados, entretanto, o desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica é apontado como um fator importante. Com o objetivo de mimetizar a condição clínica mais semelhante com a da sociedade atualmente, diversos protocolos de restrição crônica de sono emergiram e são aplicados no contexto da DP com o intuito de estabelecer sintomas ou biomarcadores para o diagnóstico precoce da doença. Desta forma, nós investigamos se haveria um papel sinérgico da restrição crônica de sono e da lesão da substância negra *pars compacta* na promoção do *deficit* olfatório. Foi realizada cirurgia estereotáxica em ratos Wistar machos para infusão intranigral de rotenona. Após 10 dias de recuperação da cirurgia, foi iniciado o protocolo de restrição crônica de sono por *gentle handling* durante 21 dias. Ao término da restrição, os animais realizaram o teste de discriminação olfatória. Outro grupo de animais passou pelo mesmo protocolo, sendo que após os 21 dias de restrição, realizaram 2 dias de sono rebote, seguido pelo mesmo teste. Observou-se que a restrição crônica de sono promoveu um comprometimento da discriminação olfatória, sugerindo uma supersensibilidade de receptores D2, de natureza inibitória. Os animais lesionados que foram restritos, apresentaram um prejuízo olfatório mais acentuado quando comparados ao grupo controle sem lesão. Além disso, o sono rebote foi capaz de restaurar a função olfatória em todos os grupos, contudo, não foi possível afirmar se houve um mecanismo compensatório de neurônios remanescentes, devido à não homogeneidade da coleta para análise imuno-histoquímica.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, dopamina, restrição crônica de sono, distúrbios olfatórios.

ABSTRACT

Parkinson's disease is characterized by the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* and the presence of Lewy bodies. It has a preclinical, prodromal period, characterized by sleep disorders (excessive daytime sleepiness, insomnia, REM sleep disturbance) and olfactory disorders (hyposmia) that precede the onset of the characteristic motor symptoms of the disease by 20 years. The involved mechanisms in these clinical features are not yet completely understood, therefore, the imbalance of dopaminergic neurotransmission is pointed as an important factor. In order to mimic a clinical condition more similar to our society nowadays, several sleep restriction protocols have been raised and are applied in PD context with the objective to discover a symptoms or biomarkers for the early diagnosis of the disease. Thus, we investigated the existence of a synergistic role of chronic sleep restriction and lesion of the substantia nigra *pars compacta* in promoting olfactory deficit. Stereotactic surgery was performed on male Wistar rats for intranigral rotenone infusion. After 10 days of surgery recovery, the chronic sleep restriction protocol was started for 21 days. At the end of the restriction, the animals performed the olfactory discrimination test. Another group of animals performed the same protocol, after 21 restriction

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DOENÇA DE PARKINSON.....	13
1.2	DISTÚRBIOS MOTORES	16
1.3	DISTÚRBIOS NÃO MOTORES	17
1.4	DISTÚRBIOS OLFATÓRIOS	18
1.5	DISTÚRBIOS DO SONO	25
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	ANIMAIS	35
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
4.3	ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE ZICAM (GLUCONATO DE ZINCO + SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO)	37
4.4	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	

5.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum (Liu et al., 2015). O processo patológico possui uma progressão lenta e contínua e envolve diversos sistemas de neurotransmissão, sendo macroscopicamente caracterizada pela despigmentação ventro lateral da substância negra *pars compacta* (SNpc) (Lozano, Lang, Hutchisonj, & Dostrovsky, 1998). A degeneração de 60 a 70% dos neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc resulta em diversos prejuízos na realização de movimentos como, por exemplo, a bradicinesia, a rigidez muscular, o tremor em repouso resultando em distúrbios na marcha e na postura (Lang and Lozano, 1998; Braak et al., 2008).

Anteriormente à degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra, ocorre a formação de inclusões fibrilares citoplasmáticas, conhecidas como corpos de Lewy, que contém ubiquitina e alfa-sinucleína (Baba et al., 1998). A vulnerabilidade seletiva de neurônios induz a um padrão distinto de distribuição das lesões (H. B. E. Braak, 2000). A DP possui um período pré-clínico, ou prodrômico, no qual o processo patológico já se iniciou em áreas do tronco encefálico e do bulbo olfatório, mas os sintomas motores, necessários para o diagnóstico, estão ausentes. Entre os sinais e sintomas não-motores, que precedem os motores em até 20 anos, estão os distúrbios do sono (sonolência diurna excessiva, insônia, distúrbio comportamental de sono REM) e distúrbios olfatórios (hiposmia/anosmia) (Doty, 2007; Sharma, Goyal, Pv,

& Acharya, 2018; Tissingh, Berendse, Bergmans, & Dewaard, 2001). Portanto, a investigação desses distúrbios prodrômicos configura-se como uma importante janela de oportunidade para um entendimento fisiopatológico mais claro da doença, bem como pela proposição de novas estratégias terapêuticas.

Diversos fatores estão envolvidos na degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal sendo os principais: disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, toxinas exógenas, acúmulo intracelular de metabólitos tóxicos, infecção viral e excitotoxicidade (Lang and Lozano, 1998). Além destes, a influência genética (forma familiar) é responsável por 5% dos casos, estando relacionada à mutações nos genes *α -syn*, *parkin*, *PINK-1*, *DJ-1*, *LRRK2*, conhecidos por estarem envolvidos na formação de corpúsculos de Lewy (Miki et al., 2017). A DP esporádica, de causa desconhecida, portanto, corresponde à imensa maioria dos casos possuindo uma forte correspondência com danos oxidativos e distúrbios mitocondriais (Dexter et al., 1989; Betarbet et al., 2000).

Considerando os modelos animais da DP, destaca-se o induzido pela administração da rotenona que é um pesticida altamente lipofílico (Liu et al., 2015). Seu mecanismo se dá pela inibição crônica do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (um dos 15 complexos enzimáticos específicos do interior da membrana mitocondrial envolvido em fosforilação oxidativa) promovendo uma degeneração dopaminérgica estriatal seletiva associada ao comportamento de hipocinesia e rigidez (Betarbet et al., 2000). Este pesticida é um composto derivado de raízes de plantas encontradas nas espécies dos gêneros *Derris*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia*, é comumente utilizada como inseticida e piscicida. Acreditava-se ser segura, como uma alternativa aos

pesticidas sintéticos. Por ser extremamente hidrofóbica, a rotenona atravessa facilmente membranas biológicas, e não depende de transportador de dopamina no citoplasma, como é o caso do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Betarbet et al., 2000). Animais tratados com rotenona apresentaram os déficits motores e posturais característicos da DP, com a severidade dos mesmos dependendo da extensão da lesão (Moreira et al., 2012; Betarbet et al., 2000).

Indivíduos estão suscetíveis à exposição de diversos agentes ambientais naturais ou sintéticos por ingestão, inalação, ou por contato com a pele (Liu et al., 2015). Enquanto as causas esporádicas da DP, que correspondem a 90% dos casos, continuam desconhecidas, diversos estudos epidemiológicos sugerem uma associação entre a incidência da DP e pesticidas (Gorell, Johnson, Rybicki, Peterson, & Richardson, 1998). A rotenona promove prejuízo na função motora, depleção de dopamina no estriado, degeneração nigroestriatal, acúmulo de alfa-sinucleína com expressão dependente de tempo. Também foram observadas disfunções do trato gastrointestinal e déficit olfatório em estágios iniciais (Liu et al., 2015). De maneira interessante, o sistema nervoso entérico e o bulbo olfatório (BO) são as únicas estruturas do sistema nervoso expostas a substâncias ambientais (Liu et al., 2015). O acúmulo de alfa-sinucleína possui diversos níveis, dependente do tempo de exposição à rotenona (Liu et al., 2015). Acredita-se que o acúmulo de alfa-sinucleína potencialmente contribua para a perda de células dopaminérgicas (Liu et al., 2015).

Mais recentemente, destaca-se na literatura o envolvimento de processos inflamatórios advindos tanto de um contexto de lesão dopaminérgica primária, ou mesmo, retro-alimentando a neurodegeneração já em curso (Calabrese et al., 2018;

Gelders, Baekelandt, & Perren, 2018; Rocha, Miranda, & Sanders, 2018; Pal et al. 2016; Reksidler et al., 2007; Lima et al., 2006; Teisman et al., 2004;). Portanto, sugere-se que os mecanismos neuroinflamatórios poderiam corresponder mutuamente a um processo de causa e consequência relacionado à neurodegeneração dopaminérgica (Dzamco et al., 2015).

1.2 DISTÚRBIOS MOTORES

Clinicamente, a DP é caracterizada por três sinais cardinais: bradicinesia, rigidez muscular e tremor em repouso (Klockgether, 2004). Dentre estes, a rigidez muscular é a que mais contribui para a incapacidade motora associada à progressão da doença (Benincasa, 2007). A bradicinesia, por sua vez, se refere à lentificação motora, estando diretamente relacionada à rigidez muscular, portanto, impactando diretamente na execução de movimentos motores voluntários (Benincasa, 2007). Outra faceta motora diz respeito ao tremor em repouso que é a manifestação cardinal mais notável em pacientes com a DP, sendo que originou o nome, pela descrição clínica de James Parkinson (1817) da doença como paralisia agitante (*shaking palsy*). Muitos pacientes sofrem com o tremor em repouso, não apenas por incapacitar o paciente, mas por estigmatizá-lo como Parkinsoniano (Benincasa, 2007). Esses sinais cardinais dependem intimamente da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Hughes, Daniel, Kilford, & Lees, 1992).

1.3 DISTÚRBIOS NÃO MOTORES

As alterações neuropatológicas extranigrais estão fortemente correlacionadas aos sintomas não motores da DP (Hawkes, Del, & Braak, 2010). Com isso, o interesse em identificar os mecanismos relacionados ao surgimento desses marcadores prodrômicos da DP está aumentando (H. Braak & Tredici, 2017; Garcia-ruiz, Espay, & Garcia-ruiz, 2017; Rocha et al., 2018). A literatura aponta como sintomas não motores os distúrbios olfatórios, de sono, depressão e distúrbios autonômicos. A identificação de sintomas prodrômicos auxiliaria no diagnóstico precoce da doença e pode ser útil no futuro para a implementação de tratamentos que possuam potencial neuroprotetivo (Benincasa, 2007). É importante entender os sinais e sintomas não motores porque eles têm um impacto significativo na qualidade de vida e podem exercer um papel crítico na definição de população de risco para futuras tentativas de prevenção da doença (Adler & Beach, 2016).

Os distúrbios autonômicos ou disautonomias, são caracterizadas por uma atrofia multisistêmica ocorrendo em diferentes graus de severidade na DP (Benincasa, 2007). Observa-se degeneração e/ou disfunção dos núcleos autonômicos como o núcleo dorsal motor do vago, o núcleo ambíguo, e outros núcleos medulares que exercem controle diferenciado dos neurônios pré-ganglionares simpáticos por vias descendentes (Hawkes et al., 2010; Lau & Breteler, 2006). Além da degeneração de núcleos colinérgicos, sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos e serotoninérgicos podem promover modulação anormal nas vias do sistema nervoso autônomo. Dentre os principais distúrbios autonômicos, pode-se citar a constipação, que afeta muitos pacientes e já é considerada uma manifestação prodrômica (Magerkurth, 2005).

Sintomas psiquiátricos também antecedem a manifestação de sintomas motores. A depressão aflige cerca de 45% de pacientes com DP (Burn, 2002). A depressão não está relacionada necessariamente com a severidade dos sintomas motores da doença. Além disso, a identificação da depressão na DP é baseada na percepção subjetiva como a sensação de incapacidade, redução da reação a estímulos emocionais, e incapacidade de sentir prazer com coisas ou eventos (anedonia) (Schneider, Iourinets, & Richard, 2017; Storstein, 2017). A depressão está relacionada com prejuízos nas vias dopaminérgicas, serotoninérgicas, e noradrenérgicas. A depressão na DP difere da depressão clássica, já que pacientes Parkinsonianos possuem um nível maior de disforia e irritabilidade, pessimismo sobre o futuro e baixa auto estima (Remy, Doder, Lees, Turjanski, & Brooks, 2005). A ansiedade também é comum na DP e pode preceder os sintomas motores. Pode estar presente na forma de ataques de pânico, fobia ou ansiedade generalizada (Benincasa, 2007).

É importante ressaltar que nenhum dos sintomas prodrômicos são específicos da DP, uma vez que todos eles ocorrem em doenças idiopáticas ou durante o curso de qualquer doença neurodegenerativa, como a doença de Alzheimer. Entretanto, possuem alta sensibilidade, o que justifica o elevado número de pesquisas voltado para estes sintomas (Sauerbier, Rosa-grilo, & Qamar, 2017; Adler & Beach, 2016; Hoyt, 2005.).

1.4 DISTÚRBIOS OLFATÓRIOS

Os distúrbios olfatórios e de sono apresentam alta prevalência na DP (mais de 90% e até 90%, respectivamente) e foram alvo de nossa investigação. Braak sugere

que o processo patológico da DP avança numa sequência previsível, iniciando no BO (Doty, 2012; Hawkes et al., 2010).

Em 1975, Ansari e Johnson foram os primeiros pesquisadores a sugerirem a associação entre distúrbios olfatórios e o desenvolvimento da DP (Johnson & Ansari, 1975). Diversos estudos se sucederam, indicando o déficit olfatório como um sintoma prodromático da DP (Doty, Deems, & Stellar, 1988; Müller, Reichmann, Livermore, & Hummel, 2002; Tissingh et al., 2001). Mais de 50% dos pacientes com DP sofrem anosmia, 35% sofrem de anosmia severa e 14% possuem anosmia moderada (Müller et al., 2002). Os pacientes demonstram uma diminuição da capacidade de identificar e discriminar odores (Tissingh et al., 2001). A prevalência desses distúrbios acomete 90% dos pacientes, valor este mais alto do que a prevalência do tremor (Doty, 2007). O déficit olfatório na DP depende do dano aos neurônios dopaminérgicos do bulbo. Além disso, este déficit não é responsivo a fármacos antiparkinsonianos e não está relacionado com a severidade do déficit motor (Doty et al., 1988). Corpúsculos de Lewy foram observados no bulbo olfatório, trato olfatório e córtex piriforme em pacientes com DP idiopática (Cramer et al., 2009).

Em roedores, o sistema olfatório é crítico para funções de reprodução e maternidade, regulação neuroendócrina, respostas emocionais, agressão e reconhecimento de presas e predadores. Embora em humanos este sistema não apresente acentuado efeito comportamental e endócrino, ainda é importante para seleção de alimentos, memória afetiva e percepção de sabores, já que o sistema olfatório e gustativo estão interligados (Doty et al., 1988; Ennis, Puche, Holy, & Shipley, 2015).

Neurônios sensitivos olfatórios expressam genes que codificam mais de 1.000-1.500 receptores olfatórios distintos (Ennis et al., 2015). A percepção do olfato inicia-se com o estímulo de neurônios olfatórios sensitivos por químicos voláteis, que ao atravessarem uma camada de muco, resultam na transdução do sinal pelo contato com cílios localizados no epitélio. No epitélio olfativo, estão os receptores olfativos (RO) que atuam como quimiossensores para a detecção de odores. Os ROs são proteínas transmembrana, acopladas à proteína G, que quando ligadas à molécula de odor, ativa um tipo específico de proteína G, a proteína G olfativa trimérica (Golf) (Figura 1). A Golf, por sua vez, ativa a isoforma olfativa da adenilato ciclase (AC3), promovendo um aumento de Adenosina Monofosfato Cíclica (AMPC). O aumento de AMPC promove despolarização da célula por promover a abertura de canais catiônicos, permitindo o influxo de íons sódio e íons cálcio. Para que o processamento olfatório ocorra, foi comprovado por modelo de anosmia em ratos knockout da Golf (Belluscio, Gold, Nemes, & Axel, 1998), AC3 (Wong et al., 2000) e subunidades de canal iônico (Brunet, Gold, & Ngai, 1996), a presença obrigatória de canais iônicos, AC3, Golf na maquinaria olfativa (Ennis et al., 2015; Mombaerts, 2004).

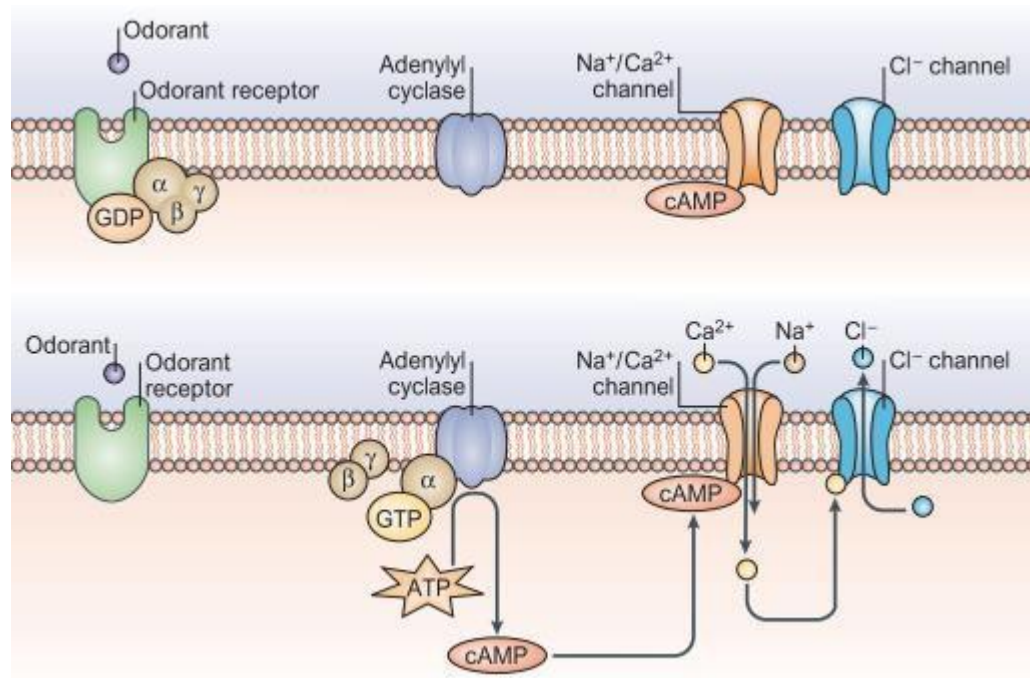


FIGURA 1. Transdução do estímulo olfatório (Mombaerts, 2004).

O processamento de estímulos olfatórios, em humanos, ocorre em diferentes estruturas do sistema olfatório. Iniciando no nariz ao entrar em contato com o epitélio olfatório, bulbo olfatório e estruturas superiores, como o córtex piriforme que é o responsável em distribuir para diversas regiões do sistema nervoso, informação proveniente do bulbo olfatório (Ennis et al., 2015). Em roedores, o processamento da informação olfatória ocorre por meio de duas vias: via olfatória principal e via olfatória acessória (ou sistema vomeronasal, considerada uma via secundária) (Figura 2) (Ennis et al., 2015). O bulbo olfatório principal é o principal sítio de processamento da informação olfatória no cérebro e transmite informação sobre estímulos olfatórios voláteis de natureza não social. Já a via olfatória acessória, transmite informações provenientes de estímulos não voláteis e processa informação de natureza tanto social (idade, sexo,

parentesco, etc) quanto não social (Salazar, Barrios, & Sánchez, 2016).

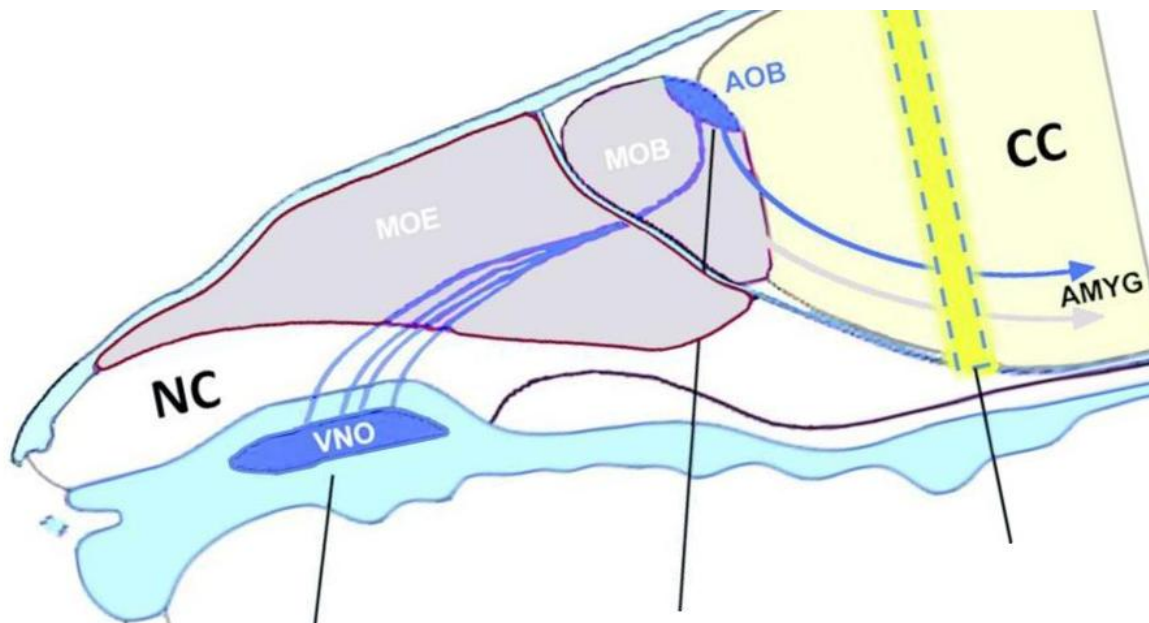


FIGURA 2. Representação esquemática de estímulos olfatórios em roedores. NC cavidade nasal, CC cavidade cranial, VNO órgão vomero nasal, MOE epitélio olfatório MOB, MOE bulbo olfatório principal, AOB (bulbo olfatório acessório) com projeção para a amígdala (AMYG) (Salazar et al., 2016.).

Esse sinal será conduzido por meio de neurônios olfatórios sensitivos que se projetam para o neuroepitélio do bulbo olfatório, após transpassarem a lâmina cribiforme e a lâmina própria. Ao atingir seu alvo na camada glomerular, é realizada uma sinapse de segunda ordem com neurônios dentro do glomérulo. O BO é dividido em diversas camadas (da mais superficial a mais profunda): camada glomerular, camada plexiforme externa, camada das células mitrais, camada plexiforme interna, camada granular e camada sub-ependimal. No BO existem neurônios de saída como as células mitrais e tufoas e os interneurônios, como células justaglomerulares e granulosa.

Os axônios dos neurônios sensitivos olfatórios projetam-se para o glomérulo, que é a unidade funcional do processamento do odor. (Shao, Liu, Zhou, Puche, & Shipley, 2019). Todo o processamento de informação no glomérulo envolve redes neurais. O glomérulo é constituído por células periglomerulares, células tufoas e mitrais, que

projetam a informação olfatória para áreas corticais. As células mitrais e tufoas são moduladas pelos interneurônios periglomerulares (Figura 3) (Duda, 2010).

As células periglomerulares são interneurônios que liberam concomitantemente DA e ácido gama-aminobutírico (GABA). Possuem ação inibitória sobre as células mitrais e tufoas modulando, desta forma, o estímulo olfatório uma vez que as células mitrais possuem receptores dopaminérgicos da família D2, que possui ação inibitória (Gabellec, Moigneu, Chaumont, & Lledo, 2014). Estes neurônios periglomerulares encontram-se aumentados em modelos de rotenona (foi observado aumento de 50% de interneurônios periglomerulares em ratos com administração intranigral de rotenona) (Rodrigues et al., 2014) sugerindo um aumento compensatório à perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (Doty, 2012). Outra hipótese é a de que as projeções colinérgicas, serotoninérgicas e noradrenérgicas que antes exerciam um papel modulatório inibitório nas células mitrais, encontram-se reduzidas nas doenças neurodegenerativas. Com a não inibição das células mitrais, as mesmas encontram-se mais ativas, culminando em um aumento dos interneurônios periglomerulares, que possuem ação inibitória já que liberam DA e GABA, para modular a atividade do glomérulo como uma resposta à falta de inibição (Ordon & Luquin, 2013).

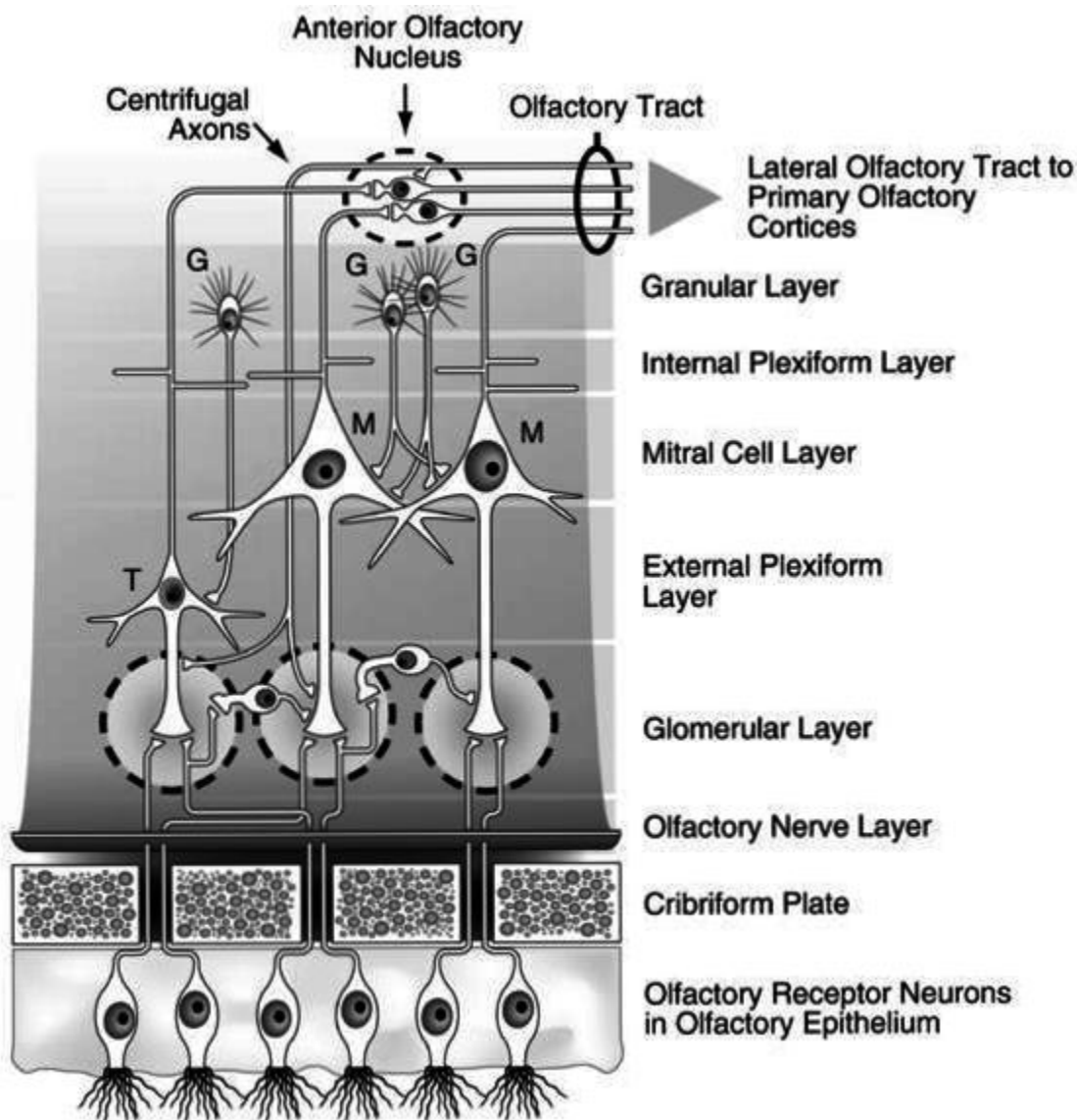


FIGURA 3. Representação da condução de estímulos olfatórios desde o epitélio olfatório até a projeção para o córtex primário (Duda, 2010).

No bulbo olfatório em pacientes com DP ocorre a presença de corpos de Lewy e de células mitraes e tufoas (Doty, 2007). Paradoxalmente, o bulbo olfatório desses pacientes não apresenta depleção dos níveis de dopamina. Pelo contrário, os neurônios positivos para tirosina hidroxilase estão aumentados em 100%, produzindo uma

neurotransmissão aberrante no bulbo (Huisman & Hoogland, 2004). É descrito aumento dos interneurônios dopaminérgicos periglomerulares localizados na camada glomerular do bulbo olfatório (Gabellec et al., 2014). Este fenômeno é descrito tanto em humanos (Ordon & Luquin, 2013) quanto em ratos (Rodrigues et al., 2014).

Esta superexpressão de dopamina no BO é comum em pacientes com DP e em modelos animais dessa doença. Danos aos sistemas de neurotransmissão colinérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos estão potencialmente envolvidos (Doty, 2012).

1.5 DISTÚRBIOS DO SONO

Os distúrbios de sono na DP possuem uma etiologia multifatorial, mas a degeneração patológica do centro regulador de sono no tronco encefálico e vias talamocorticais possuem um papel importante. Distúrbio do sono REM (RBD), presente na DP, é caracterizada por episódios de comportamentos motores de violência, associados a comportamentos defensivos em caso de ameaça e vocalizações (Fantini, 2002). RBD pode representar um sintoma prodrômico da DP, principalmente quando associado ao distúrbio olfatório (Behr, Oertel, Mayer, Doerr, & Mo, 2005). A prevalência de RBD em pacientes com DP é estimada entre 15 e 33%, aumentando para 57% quando considerado casos subclínicos de RBD (Bundlie, 1996). Além de RBD, a sonolência diurna excessiva também é considerada um sintoma pré-motor da DP (Abbott et al., 2012).

Sabe-se da importância do sono e que ele exerce um papel vital, estudos apontam para diferentes papéis do sono. As funções do sono ainda são controversas e enigmáticas para a ciência. Mesmo autores apontando diferentes funções para o sono,

todas divergem para a vantagem evolutiva do mesmo. Acredita-se exercer uma função restauradora, com a eliminação de possíveis substâncias tóxicas provenientes da atividade neuronal exercida durante a vigília (Xie et al., 2013). Além disso, o sono é importante na conservação de energia, uma vez que comportamentos durante o estado de vigília demandam muita energia, e seria inviável para o organismo de mantê-la (Siegel, 2009). Outro papel importante do sono é o de aprendizado e da consolidação da memória, esses processos são muitas vezes essenciais para a sobrevivência de uma espécie, como por exemplo recordar onde encontram-se predadores e refúgio (Krueger, Frank, Wisor, & Roy, 2016).

Dormir é um processo dinâmico e que é dividido em estágios de acordo com o padrão de ondas observado no eletroencefalograma (EEG), além de outras variáveis fisiológicas como temperatura corporal, tônus muscular, padrão cardiorrespiratório e presença de movimentos oculares rápidos (Sharma et al., 2018; Troynikov, Watson, & Nawaz, 2018). É importante identificar esses estágios para que na clínica seja possível identificar pacientes com distúrbios do sono (Boostani, Karimzadeh, & Nami, 2017).

Em humanos, o sono é dividido em sono REM (*rapid eye movement*) e 3 estágios de sono NREM (*non-REM*). O estágio N1 do sono NREM (Figura 4) é o primeiro estágio do sono, caracterizado como sono leve e o período de fácil despertar. Os músculos começam a relaxar podendo haver contrações e sensação de queda. As ondas possuem baixa voltagem, com duração de no máximo 0,5 segundos e frequência variando entre 4 a 7 Hz (Å & Maclean, 2007; Boostani et al., 2017; Datta, 2010; Reich, 2018; Sharma et al., 2018; Troynikov et al., 2018).

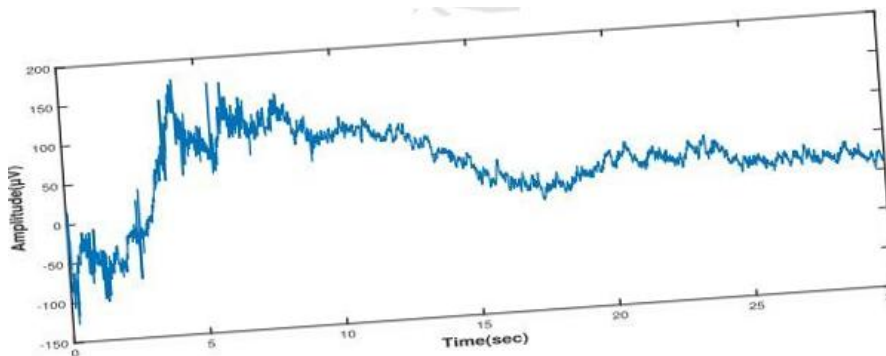


FIGURA 4. Representação EEG da onda N1 (Sharma et al., 2018).

O estágio N2 (Figura 5) está presente no início do sono, há redução da temperatura corporal e da frequência cardíaca. As ondas observadas possuem baixa amplitude e frequência variável (0.1 a 4 Hz), com presença dos fusos do sono que são ondas de alta frequência (13-14 Hz) e do complexo K (representado por uma onda negativa com a ocorrência imediata de uma onda positiva) (Å & Maclean, 2007; Boostani et al., 2017; Datta, 2010; Reich, 2018; Sharma et al., 2018; Troynikov et al., 2018).

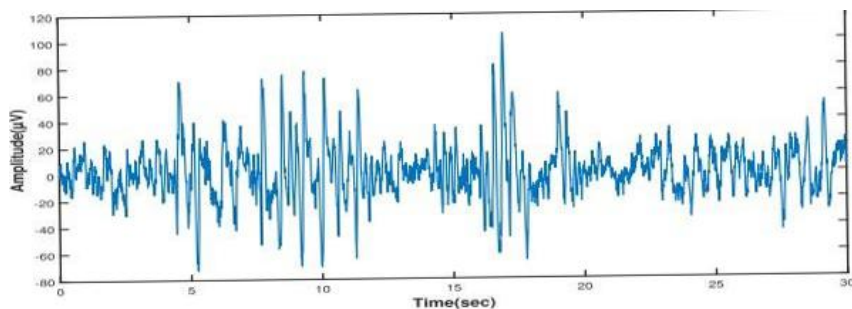


FIGURA 5. Representação EEG da onda N2 (Sharma et al., 2018).

O estágio N3 (Figura 6) é conhecido como o sono de ondas lentas pois possui ondas de baixa frequência (0.5 a 2 Hz) com amplitude superior a 75mV. Neste estágio a atividade cerebral e o tônus muscular apresentam-se reduzidos (Å & Maclean, 2007; Boostani et al., 2017; Datta, 2010; Reich, 2018; Sharma et al., 2018; Troynikov et al., 2018).

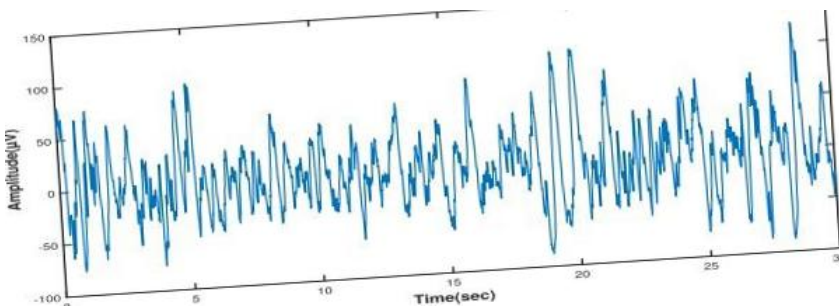


FIGURA 6. Representação EEG da onda N3 (Sharma et al., 2018).

As ondas no período de vigília variam de 8 a 13 Hertz (Hz) no eletroencefalograma (EEG) (Figura 7). Há ainda a presença de ondas alfa e tônus muscular (Ã & Maclean, 2007; Boostani et al., 2017; Datta, 2010; Reich, 2018; Sharma et al., 2018; Troynikov et al., 2018).

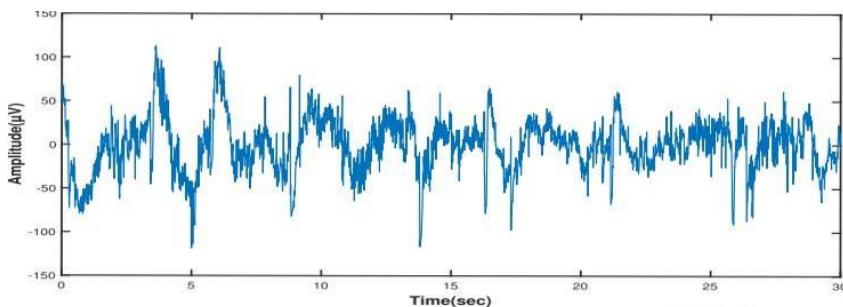


FIGURA 7. Representação EEG durante o estado de vigília (Sharma et al., 2018).

O estágio de sono REM é caracterizado pelo movimento rápido dos olhos, ondas de alta frequência e baixa voltagem (Figura 8). É neste estágio que ocorrem os sonhos em humanos, há perda do tônus muscular (atonia) e aumento da frequência respiratória. Além disso, as ondas dessa fase são similares ao estado de vigília (Ã & Maclean, 2007; Boostani et al., 2017; Raza, Anjum, & Shakeel, 2019).

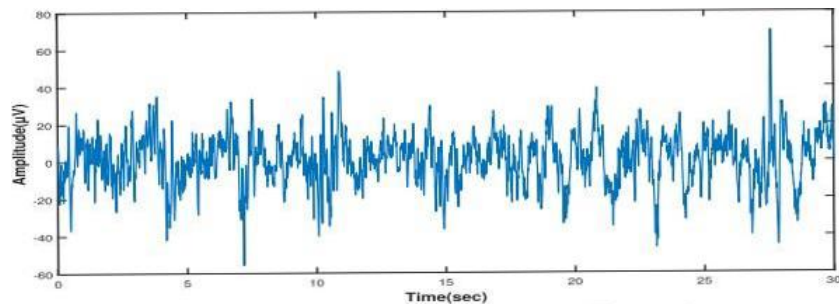


FIGURA 8. Representação EEG durante o sono REM (Sharma et al., 2018).

Os estágios de sono observados por EEG podem variar de acordo com as espécies. Por exemplo, ratos, camundongos e ratos possuem apenas 2 estágios de sono NREM (Å & Maclean, 2007).

Ao observar que a privação do sono REM era capaz de promover uma hipersensibilidade dos neurônios dopaminérgicos, foi sugerida a associação entre o sono e o sistema dopaminérgico (Psicobiologia & Borucaru, 1981). Portanto, a presença de distúrbios do sono REM em pacientes com DP reflete um envolvimento da neurotransmissão dopaminérgica em estruturas relacionadas ao sono REM (Lima, 2012). Na DP a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc culmina em diversos distúrbios do sono como: insônia, síndrome das pernas inquietas (no qual o tratamento inclui administração de agonistas dopaminérgicos), sonolência diurna excessiva e distúrbio comportamental do sono REM (sonhos vívidos, geralmente violentos, associados à ativação motora durante a fase de sono REM e tratado com agonista dopaminérgico) (Albers, Ph, Chand, Anch, & Ph, 2017; Lozano et al., 1998).

Para melhor entendimento da relação entre o sistema dopaminérgico e o sono, diversas manipulações foram realizadas nos receptores dopaminérgicos. Os receptores dopaminérgicos são compreendidos em 2 grandes famílias: D1 e D2. A família D1 é caracterizada pelos receptores pré-sinápticos excitatórios D1 e D5 (acoplados à proteína

Gs) que ativam a enzima adenilato ciclase quando ativados. A família D2 pode atuar como receptor pós-sináptico ou como autorreceptor, compreende os receptores D2, D3 e D4, que inibem a adenilato ciclase e estão acoplados à proteína Gi (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Já foi observado que o bloqueio de receptores D2 promoveu uma supressão de sono REM mesmo após a privação de sono REM enquanto agonista D2 não promoveu um aumento do sono REM (Rodrigues et al., 2014).

Muitos autores demonstraram que a administração de um agonista D1 promoveu a vigília e que um antagonista promoveu efeito contrário (Eder, Zdravkovic, & Wildschjødtz, 2003; Ferri & Introduction, 1991; Hyacinthe, Barraud, Tison, Bezard, & Ghorayeb, 2014). A administração de antagonista D1 aumentou o número de episódios de sono REM (Hyacinthe et al., 2014). Já a administração de antagonista D2, foi capaz de diminuir significativamente a porcentagem de sono REM no período de sono rebote, após 96 horas de privação de sono (Lima, Reksidler, Vital, & Postal, 2008).

Portanto, embora os agonistas dos receptores dopaminérgicos geralmente serem considerados como promotores da vigília, sua ação depende do tipo de receptor dopaminérgico envolvido. Fármacos que aumentam a liberação de dopamina, seja agonista não seletivo ou agonista seletivo para receptor D1, promovem vigília. Entretanto, receptores agonistas D2 possuem diferentes ações no ciclo de sono vigília, podendo ser responsável pelo estado de sono ou de vigília. Esta ação dual dos receptores D2 provavelmente seja devido à presença da família dos receptores D2 tanto em neurônios pré-sinápticos quanto pós-sinápticos (Herrera-morales, 2017).

Além disso, a localização de receptores D2 na área tegmental ventral como autorreceptores, sugere um mecanismo de feedback negativo para os neurônios

dominérgicos. Logo, o sono REM também sofre influência da formação reticular devido às projeções recíprocas da área tegmental ventral e SNpc (Lima, 2012). A privação de sono tornou-se um problema de saúde importante nas sociedades modernas, podendo ser decorrente do estilo de vida (uso de dispositivos eletrônicos antes de se deitar que podem alterar a secreção de melatonina, maiores horas de trabalho, etc) ou devido a distúrbios do sono (insônia, por exemplo). É recomendado pelo menos de 7-8 horas de sono para os adultos. Entretanto, em 2014, um estudo nos Estados Unidos apontou que 1/3 dos adultos dormiram menos de 6 horas por noite (

limitação da resposta pró-inflamatória pode promover uma menor ativação da micróglia e redução do estresse oxidativo, reduzindo a morte neuronal (Taylor et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Prevê-se que a DP se torne um fardo econômico e social com o envelhecimento da população (de Lau and Breteler, 2006). Em torno de 1% das pessoas acima de 65 anos são acometidas pela doença, sendo que esta incidência sobe para 4 a 5% em pessoas acima dos 85 anos (Lang and Lozano, 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde, entre 2000 e 2015 a expectativa de vida aumentou cinco anos globalmente, evolução mais rápida desde a década de 1960. Atualmente, o Brasil encontra-se com um índice considerado intermediário com expectativa de vida de 76 anos (IBGE 2019). Estima-se que o número de pessoas idosas no Brasil aumente de 20,6 milhões para 58,4 milhões de pessoas até 2060 (OMS, 2015). Além do aumento da expectativa de vida, a aparente baixa prevalência da DP antes do século XX pode estar relacionada a mudanças no estilo de vida ao longo do curso da história da humanidade (Garcia-Ruiz and Espay, 2017).

Foi comprovada a extrema dificuldade em translacionar resultados positivos em estudos animais para o sucesso de ensaios clínicos em humanos (Neurology, 2006). Portanto, existe uma pressão para que os modelos animais da doença sejam aperfeiçoados. Além disso, o modelo animal deve ser progressivo e ter início dependente da idade (Liu et al., 2015). A terapia para a DP, no presente momento, é voltada para a melhora de sintomas clínicos ressaltando a importância em estudar os sintomas prodrômicos para tratamento precoce da doença (Rascol, Goetz, Koller, Poewe, & Sampaio, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência de déficit olfatório, como sintoma pré-motor, e suas consequências comportamentais decorrentes da restrição crônica de sono total em modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona intranigral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar as alterações olfatórias, por meio do teste de discriminação olfatória, produzidas pela associação entre a restrição crônica de sono total e a lesão dopaminérgica da SNpc.
- Identificar os comportamentos olfatórios oriundos das manipulações descritas, após o período de sono rebote.
- Quantificação imuno-histoquímica da densidade de neurônios dopaminérgicos da SNpc por meio de imuno-marcação para a enzima tirosina hidroxilase.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes preconizadas pelo CEUA/BIO da UFPR (Protocolo aprovado nº 141) que sustentam a aplicação de modernos princípios éticos que preconizam a redução, substituição e refinamento em relação ao uso de animais. Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 280-330g. Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12 h (7:00-19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Figura 9 traz o desenho experimental. Os animais foram distribuídos em 9 grupos experimentais: Zicam, DMSO controle, DMSO privado, DMSO rebote, DMSO privado rebote, rotenona controle, rotenona privado, rotenona rebote e rotenona controle rebote. O grupo Zicam correspondeu ao grupo controle positivo para anosmia, conforme será detalhado no tópico subjacente. Os grupos restantes foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de rotenona (grupo com lesão intranigral) e infusão de DMSO (grupo controle). Após 10 dias de recuperação da cirurgia, os animais passaram pelo protocolo de restrição crônica de sono *gentle handling* por 21 dias durante 6 horas diárias (grupos DMSO privado e rotenona privado). Após o período de restrição os animais foram avaliados por sua capacidade de discriminação olfatória no teste de discriminação

olfatória (detalhado nos tópicos subjacentes). Outro grupo de animais (DMSO rebote e rotenona rebote) tiveram 2 dias de sono livre, para avaliar se haveria alguma recuperação pelos prejuízos promovidos pela restrição. Após o rebote estes animais também realizaram o teste de discriminação olfatória. Haviam ainda os grupos controle (DMSO controle e rotenona controle) que dormiram livremente por todo o período de 21 dias, e ainda o grupo controle do rebote (DMSO controle rebote e rotenona controle rebote) que dormiu livremente por 23 dias (tempo de restrição dos outros grupos + 2 dias de sono rebote). Estes grupos realizaram o teste de discriminação olfatória logo após o término de seus respectivos períodos. No dia dos testes foi realizada a eutanásia dos animais com retirada de estruturas (SNpc e BO) ou realização da perfusão do encéfalo para a montagem de lâminas. Além disso, os animais foram pesados diariamente desde o primeiro dia da privação até o dia dos testes como acompanhamento da influência dos tratamentos na sobrevivência do animal.

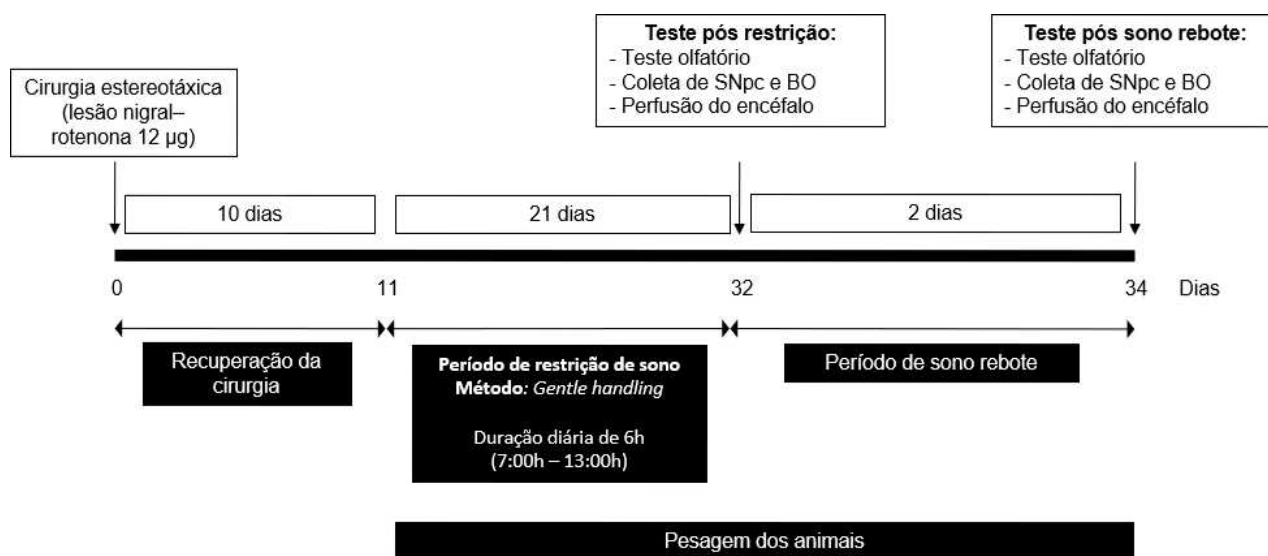


FIGURA 9. Representação esquemática do desenho experimental (fora de escala). Após a recuperação de 10 dias da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos à restrição crônica de sono total, seguido de testes comportamentais e coleta de amostra. O grupo rebote terá 2 dias de sono rebote seguido de testes comportamentais e coleta de amostra (SNpc e bulbo olfatório).

4.3 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE ZICAM (GLUCONATO DE ZINCO + SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO)

A administração de Zicam® (Matrixx Initiatives, Scottsdale, AZ, USA) foi realizada de acordo com previamente descrito na literatura (Lim et al., 2009; Rodrigues et al., 2014): os animais foram sedados pela administração intraperitoneal de 90mg/kg de quetamina e 3mg/kg de xilazina, seguido pela cuidadosa administração de 30 µL de Zicam na cavidade nasal por meio de uma seringa de Hamilton conectada a um tubo de polietileno. A cânula de polietileno foi inserida com 15mm de profundidade na narina do animal para que irrigasse o epitélio olfatório. O procedimento foi repetido na narina contra-lateral. Durante a respiração, parte da solução foi expelida pela narina, que era absorvida por papel absorvente para permitir que o animal continuasse respirando.

4.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

sham foram injetados apenas com o veículo dimetilsulfóxido (DMSO) em iguais condições.

4.5 RESTRIÇÃO CRÔNICA DE SONO

Os animais foram mantidos acordados com o uso do método *gentle handling/stimulation* no qual foram realizadas leves intervenções nas caixas de contenção (pequenas batidas, sacudir a caixa gentilmente). Foram realizadas 6 horas diárias de restrição durante os 21 dias de experimento, com início às 7 horas (início da fase clara) e término às 13 horas. Este período corresponde a maior duração de sono dos animais. (Fagotti et al., 2019; Marcílio, Natume, Watanabe, & De, 2018). O protocolo já foi utilizado em nosso laboratório e foram observadas alterações metabólicas provenientes da associação da restrição com o modelo de rotenona (Fagotti et al., 2019).

4.6 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

Esse teste foi previamente descrito por Soffié e Lamberty, posteriormente, modificado por Prediger e colaboradores (Soffié and Lamberty 1988, Prediger et al. 2005a, Prediger et al. 2005b). O experimento consiste em colocar o rato na caixa de discriminação olfativa e registrar, durante um período de 5 minutos, o tempo que o animal gastará investigando cada um dos compartimentos. A discriminação olfatória foi avaliada pela preferência do animal em ficar no compartimento impregnado com o seu odor (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não-familiar), visto que nesta situação, tem sido demonstrado que ratos machos adultos preferem permanecer em ambientes

impregnados com seu próprio cheiro (Carr et al. 1976, Prediger et al. 2005a, Prediger et al. 2005b).

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE

Os animais foram profundamente anestesiados com quetamina imediatamente após os testes, e foram perfundidos intracardialmente primeiro com solução salina, em seguida, com solução de formaldeído 4% fixado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Os encéfalos foram removidos dos crânios e imersos durante 48 h, em solução fixadora a 4°C. Em seguida, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose 30% durante três dias e foram congelados a -80°C antes de realizar a secção. As secções da SNpc foram incubadas com anticorpo primário anti-TH, diluído em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,3% Triton X-100 (1:500; Chemicon, CA, EUA) durante a noite a 4°C. Foi realizada a incubação de um anticorpo secundário biotina-conjugado (1:200 anti-mouse # Vector Laboratories, EUA), durante 2 horas à temperatura ambiente. Após várias lavagens em solução salina tamponada com fosfato, complexo anticorpo foi localizado usando o sistema ABC (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, EUA), seguido por reação 3,30-diaminobenzidina com sulfato de níquel para aumento de contraste da reação. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas após desidratação crescente de soluções etileno-xilol. A densidade neuronal da SNpc foi determinada pelo software Image-J. O número médio de neurônios reativos a TH em cada hemisferio foi considerado como representativo para cada animal. As imagens foram obtidas pelo microscópio Xio Imager 72 (Carl Zeiss, Jana, DE), equipado de um escaner Vslide (Metasystems, Altlussheim, DE).

4.8 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA), pois foram considerados paramétricos. Utilizou-se ANOVA de duas vias para o treino e o teste de discriminação olfatória e para imuno-histoquímica, seguido do pós teste Bonferroni. Para avaliar se houve ganho ou perda de massa dos animais ao longo do experimento foi realizada ANOVA de medidas repetidas, reduzindo o n de todos os grupos a 7, seguido do pós teste Bonferroni. Os valores foram expressos como média + erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância foi considerado como p

5 RESULTADOS

5.1 TREINO DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

No treino de discriminação olfatória (Figura 10) não foi observada diferença significativa entre o tempo de exploração do compartimento localizado no lado esquerdo e compartimento do lado direito entre os animais de todos os grupos. Além disso, não houve interação entre os fatores lesão, restrição e rebote [$F(1, 76)=0.87796$, $p=0.35173$].

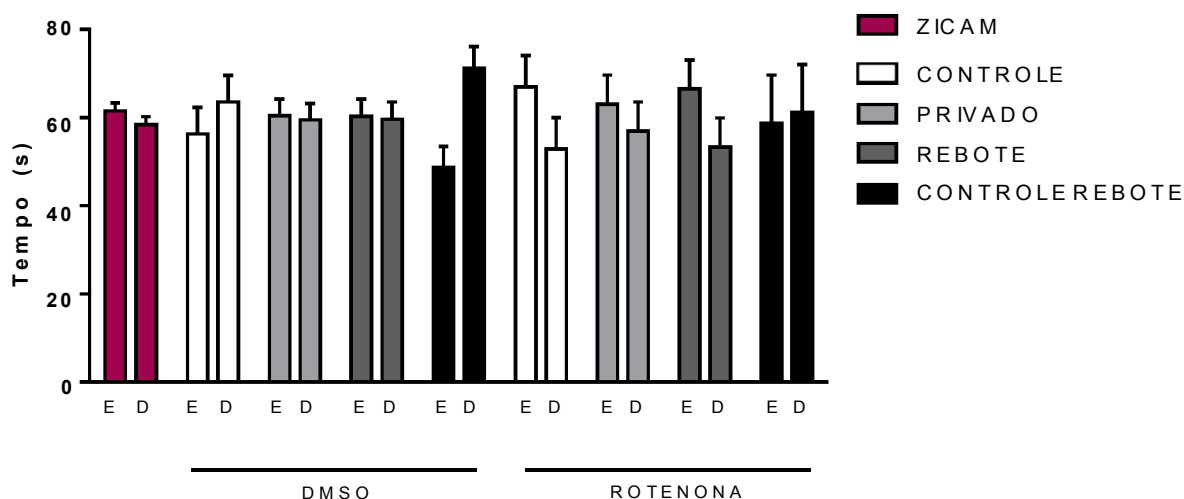


FIGURA 10. Tempo em segundos de permanência nos compartimentos familiares e não familiares no treino de discriminação olfatória. As barras representam erro \pm erro padrão da média. Está indicado no eixo x os grupos com lesão (rotenona) e sem lesão (DMSO), E refere-se ao compartimento esquerdo e D ao compartimento direito. Grupo Zicam $n= 10$, DMSO Controle $n= 13$, DMSO privado $n=11$, DMSO rebote $n=13$, DMSO Controle Rebote $n=7$, Rotenona Controle $n=13$, Rotenona Privado $n=12$, Rotenona Rebote $n=11$, Rotenona Controle Rebote $n=11$. ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

5.2 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

A análise do desempenho olfatório dos animais (Figura 11) revelou que o grupo tratado com Zicam, que corresponde ao grupo controle positivo para prejuízo olfatório,

produziu efeitos de inibição do epitélio olfatório, haja vista não ter se observado diferença significativa no tempo de exploração olfatória entre os odores familiar e não familiar. Em contrapartida, o grupo DMSO controle apresentou uma redução significativa ($P < 0,001$) de exploração do odor não familiar em comparação ao odor familiar. Além disso, observou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) de exploração do odor familiar no grupo rotenona, assim como um aumento ($P < 0,05$) do tempo de exploração do odor não familiar deste grupo em comparação ao grupo DMSO controle. Esses resultados são corroborados pelas diferenças significativas encontradas para os fatores tratamento [$F(4,43)=6,271$; $P=0,005$], odor [$F(1,43)=27,52$; $P < 0,001$] bem como pela interação destes [$F(4,43)=2,541$; $P=0,05$].

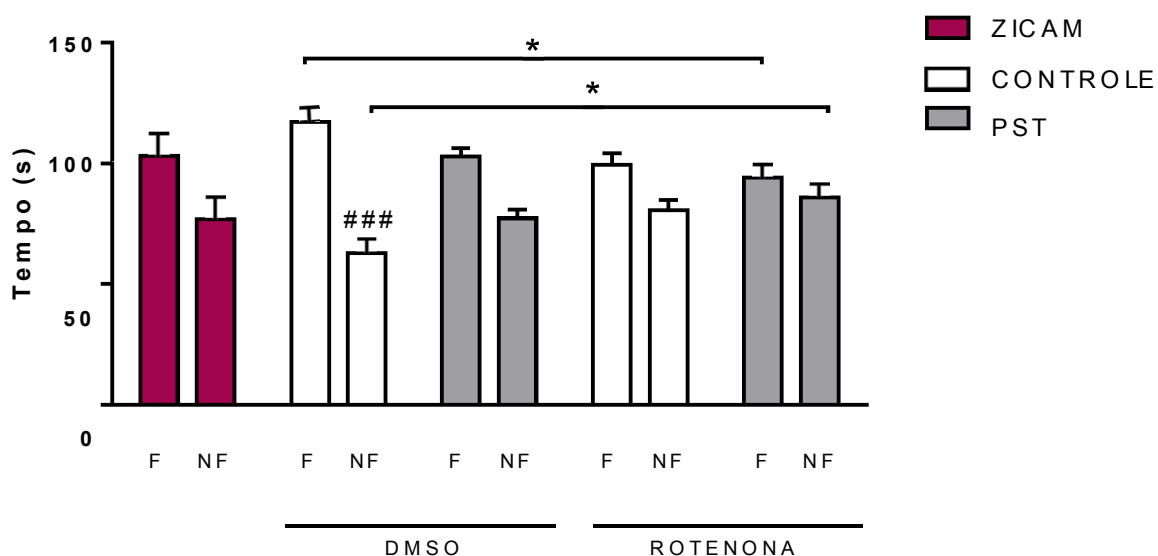


FIGURA 11. Tempo em segundos de permanência nos compartimentos familiares e não familiares no teste de discriminação olfatória após o período de privação de sono. As barras representam erro \pm erro padrão da média. Está indicado no eixo x o odor familiar (F) e não familiar (NF). Grupo Zicam $n=10$, DMSO Controle $n=10$, DMSO PST $n=10$, DMSO rebote $n=10$, DMSO Controle Rebote $n=7$, Rotenona Controle $n=13$, Rotenona Privado $n=12$. ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc Bonferroni. * $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ vs. odor familiar.

A avaliação do período rebote de sono (Figura 12) indicou haver uma restauração do desempenho olfatório dos animais tanto dos grupos DMSO controle ($P < 0,05$, odor

familiar x odor não familiar) e DMSO submetido à privação de sono (PST rebote) ($P < 0,05$, odor familiar x odor não familiar) assim como dos grupos rotenona controle (rebote) ($P < 0,001$, odor familiar x odor não familiar) e rotenona PST (rebote) ($P < 0,001$, odor familiar x odor não familiar), como indicados pelos fatores tratamento [$F(3,36)=1,128$; $P=0,35$], odor [$F(1,36)=37,19$; $P < 0,001$] bem como pela interação destes [$F(3,36)=0,516$; $P=0,67$].

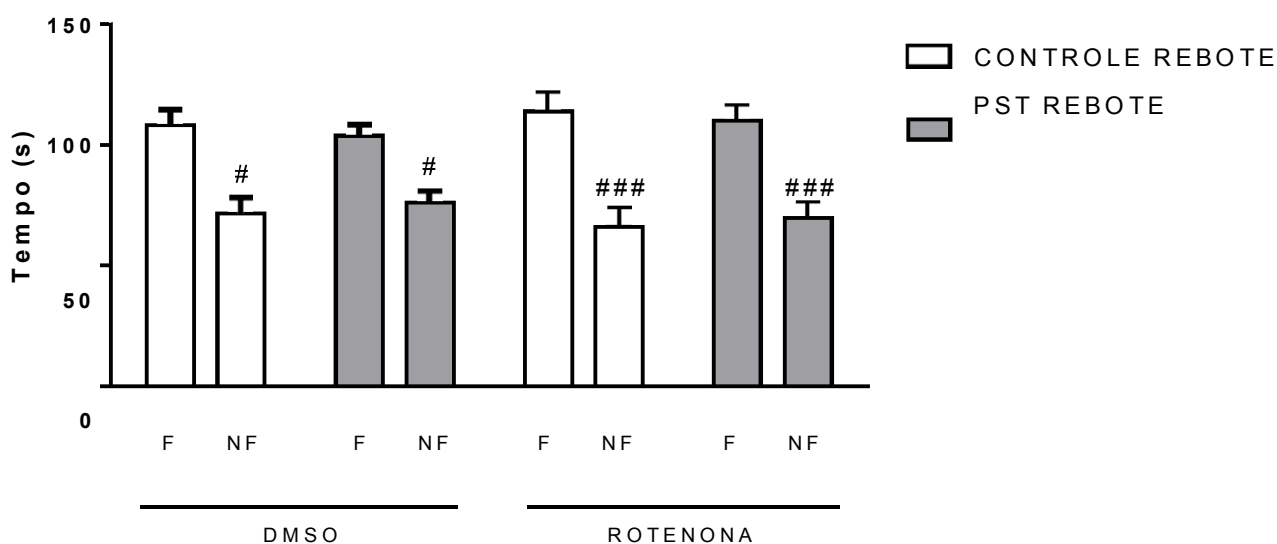


FIGURA 12. Tempo em segundos de permanência nos compartimentos familiares e não familiares no teste de discriminação olfatória após o período de sono rebote. As barras representam erro \pm erro padrão da média. Está indicado no eixo x o odor familiar (F) e não familiar (NF). DMSO Controle n= 10, DMSO pst n=10, DMSO rebote n=10, DMSO Controle Rebote n=7, Rotenona Controle n=13, Rotenona Privado n=12, Rotenona Rebote n=11, Rotenona Controle Rebote n=11. ANOVA de 2 vias seguido pelo teste post hoc Bonferroni. # $P < 0,05$ vs. odor familiar, ### $P < 0,001$ vs. odor familiar.

5.3 CONTROLE DO PESO DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados diariamente por 22 dias (do primeiro dia de privação de sono ao primeiro dia de testes), sendo que os dados relativos ao dia 9 foram desconsiderados por perdas na coleta. Observa-se um curva de ganho de peso dos

animais (Figura 13) em que se observa a ocorrência de diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(8,61)=2,657$; $P<0,01$], peso [$F(20,12)=104,8$; $P<0,0001$] e interação [$F(160,12)=1,80$; $P<0,0001$].

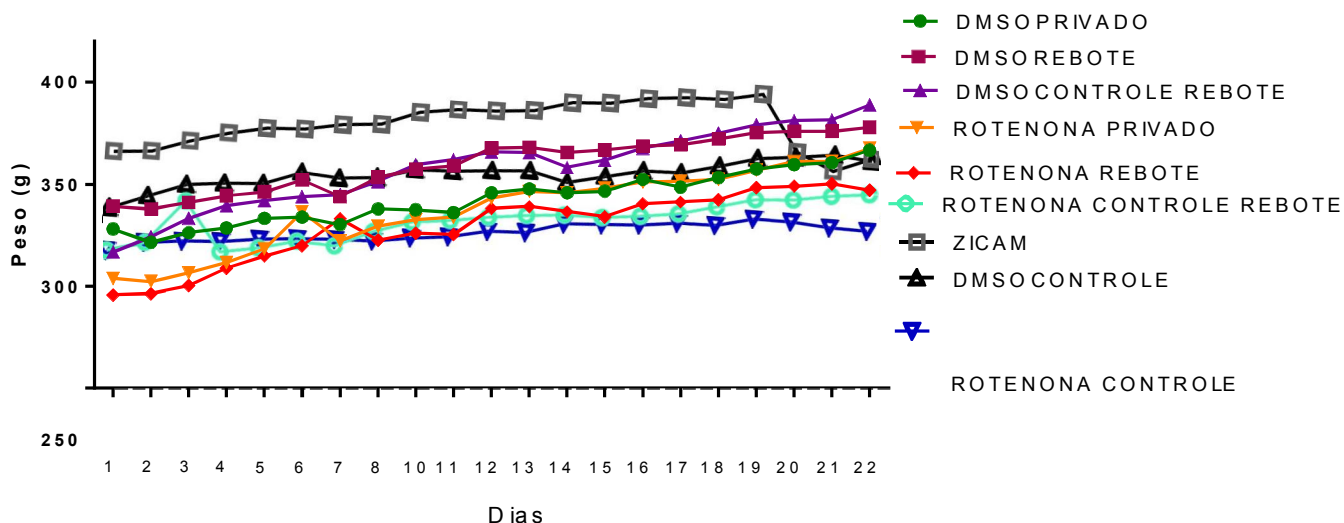


FIGURA 13. Peso em gramas dos animais do primeiro dia de privação ao primeiro dia de teste, o dia 9 foi desconsiderado. Grupo Zicam $n=7$, DMSO Controle $n=7$, DMSO privado $n=7$, DMSO rebote $n=7$, DMSO Controle Rebote $n=7$, Rotenona Controle $n=7$, Rotenona Privado $n=7$, Rotenona Rebote $n=7$, Rotenona Controle Rebote $n=7$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

5.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE

A quantificação da densidade de neurônios TH-ir na SNpc (Figura 14), produzida pela neurotoxina rotenona, revelou ter ocorrido uma redução significativa ($P<0,001$) na densidade desses neurônios no grupo DMSO controle rebote em comparação aos demais grupos experimentais, conforme indicado pelos fatores lesão [$F(1,34)=16,32$; $P=0,0003$], privação de sono [$F(1,34)=4,29$; $P=0,04$] e interação [$F(1,34)=17,98$; $P=0,0002$].

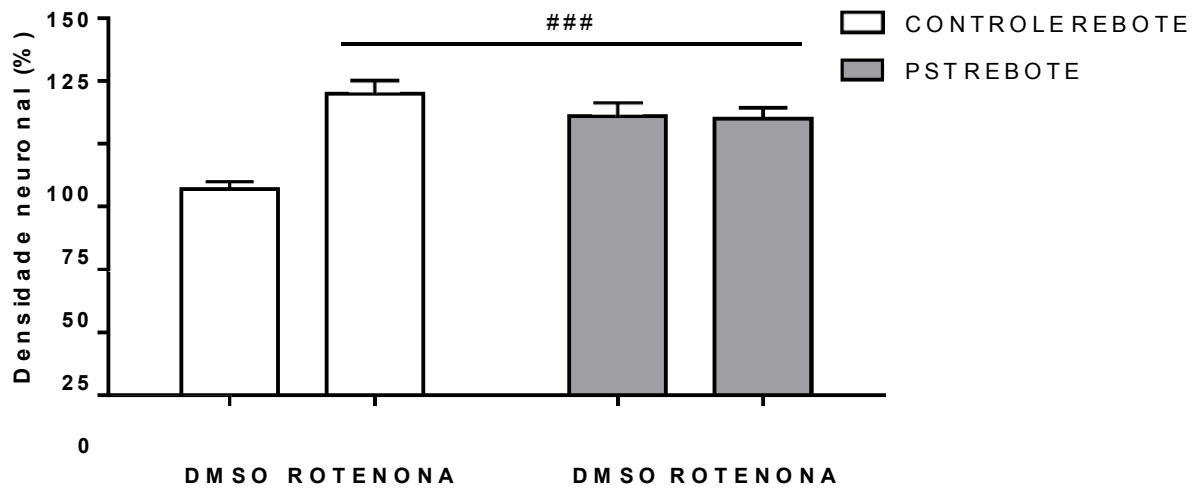


FIGURA 14. Porcentagem da densidade de neurônios TH-ir na SNpc DMSO Controle Rebote (n= 11), Rotenona Controle Rebote (n=6), DMSO PST Rebote (n=10), Rotenona PST rebote (n=11). ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc Bonferroni. ###P<0,001 vs. DMSO Controle Rebote.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que houve um prejuízo olfatório produzido pelo grupo Zicam, indicando ter havido a inibição da atividade do epitélio olfatório dos animais, produzindo assim um controle positivo para o prejuízo olfatório, tal qual já demonstrado por estudos anteriores de nosso grupo (Rodrigues et al. 2014, Ilkiw et al. 2018). O Zicam promove citotoxicidade ao epitélio olfatório, provavelmente atuando de modo irreversível (Chioca, Antunes, Ferro, Losso, & Andreatini, 2013). Com esta perspectiva, observamos ter ocorrido um prejuízo significativo de desempenho olfatório nos animais do grupo DMSO PST, em comparação ao seu controle não privado de sono, sugerindo ter havido uma associação entre a restrição crônica de sono total e a função olfatória dos ratos. Este resultado se relaciona, de maneira interessante, com outros, recentemente publicados, que demonstraram impactos negativos, advindos do protocolo de restrição de sono, aqui testado, tanto num contexto de geração de efeitos pró-nociceptivos quanto de deterioração de memórias do tipo declarativas (Sardi et al. 2018, Fagotti et al. 2019). Somando-se a essas observações, vimos que a lesão dopaminérgica, induzida por rotenona, também foi capaz de gerar semelhante piora na capacidade olfatória dos animais, entretanto, sem ter havido um, até aguardado, sinergismo com a condição de restrição crônica de sono. Porém, destaca-se aqui uma diminuição no tempo de exploração do odor familiar, bem como aumento desse tempo, para o odor não familiar, apenas no grupo rotenona PST, em comparação ao grupo DMSO controle, sugerindo algum grau de prejuízo olfatório, mais evidenciado por este grupo. Em complementação, descrevemos recentemente que a privação aguda de sono REM pôde produzir efeitos olfatórios compensatórios, quantificados pela mesma tarefa aqui testada, mediante a

lesão da via nigroestriatal induzida por rotenona (Rodrigues et al. 2019). Observou-se também que nenhuma das manipulações realizadas impactou negativamente no crescente ganho de peso dos animais ao longo dos dias de experimento, afastando assim a influência de outros fatores relacionados à sobrevivência dos animais quanto aos parâmetros avaliados.

A análise do desempenho olfatório após o período de sono rebote revelou ter havido uma restauração dessa função em todos os grupos experimentais testados, haja vista ter ocorrido uma significativa discriminação entre os odores apresentados na tarefa. Dessa forma, é plausível pensar que a reversibilidade dos efeitos advindos da restrição crônica de sono possam se dar, em parte, pelo mecanismo de supersensibilidade dopaminérgica (Tufik et al. 1978, Tufik 1981, Nunes et al. 1994, Lima et al. 2008b), classicamente descrito após eventos de privação de sono REM, podendo assim impactar em tarefas dependentes do sistema dopaminérgico. Como já descrito na literatura, a olfação apresenta uma dependência bastante singular da neurotransmissão dopaminérgica nas sinapses glomerulares, principalmente frente ao seu papel inibitório (associado à ativação do receptor D2), portanto, regulando a ativação sináptica à jusante na via olfatória principal (Hoglinger et al. 2015). Deste modo, é possível propor que a restrição crônica de sono, por nós testada, poderia gerar um crescente déficit de sono REM, ao longo dos dias de restrição, produzindo algum grau de supersensibilidade D2 que se expressaria numa piora olfatória, podendo ser restaurada pelo sono rebote.

Além disso, a administração de um agonista D2, piribedil, associado com a supersensibilidade D2, aumenta o efeito inibitório gerado pelos receptores D2, e, portanto, promovendo déficit olfatório (Rodrigues et al., 2014). Quando os receptores D2

estão ativados, a capacidade de discriminar odores é reduzida por alterar a sensibilidade de neurônios bulbares. Pela administração de agonistas e antagonistas de receptores D1 e D2, é sugerida que, primordialmente, é a modulação do receptor D2, e não de D1, que impacta na tarefa de discriminação de olfatória (Escanilla, Yuhas, Marzan, & Linster, 2009).

Em contrapartida, a restauração do desempenho olfatório, após o rebote, no grupo submetido apenas à lesão dopaminérgica, não pode ser, satisfatoriamente, explicada por essa hipótese, uma vez que a lesão, tal como já descrevemos em outras oportunidades, é um processo perene e de impactos bastante amplos (Lima et al. 2006, Lima et al. 2007, Moreira et al. 2012) embora, por vezes, compensados plasticamente pelos neurônios remanescentes (Ilkiw et al. 2018, Targa et al. 2018, Rodrigues et al. 2019). Por outro lado, os resultados da avaliação histológica não conseguiram observar reduções na densidade dos neurônios TH-ir presentes na SNpc dos animais submetidos à neurotoxina rotenona, tornando qualquer discussão baseada num efeito olfatório compensatório, pelos neurônios ainda presentes, meramente especulativa. Entretanto, cabe aqui uma ressalva metodológica que põe em xeque a reprodutibilidade dos dados histológicos produzidos. Verificou-se que os cortes obtidos a partir de coordenadas para o mesencéfalo, incluindo a SNpc, não foram homoganeamente coletados de forma a produzir uma reconstrução representativa da área de interesse. Portanto, será necessária a realização de uma replicação desse experimento de quantificação de extensão da lesão, haja vista que o processo cirúrgico utilizado é altamente padronizado, tendo sido reproduzido, inclusive com resultados histológicos de lesão de 40-50% dos neurônios TH-ir, em muitos outros trabalhos de nosso grupo (Lima et al. 2006, Lima et

al. 2007, Reksidler et al. 2007, Lima et al. 2008a, Lima et al. 2012, Dos Santos et al. 2013, Nosedá et al. 2014, Rodrigues et al. 2014, Targa et al. 2016, Ilkiw et al. 2018, Targa et al. 2018, Fagotti et al. 2019, Ilkiw and Lima 2019, Rodrigues et al. 2019).

Outro ponto relevante para reflexão diz respeito ao próprio protocolo do teste olfatório utilizado em que é conduzido apenas um treinamento de 2 minutos com os animais. Tong e colaboradores (2014) levantaram a hipótese de que tarefas de discriminação olfatória com métricas relativamente não intuitivas como odor específico do lado direito ou esquerdo, como foi realizado em nosso experimento, necessite de centenas de treinamentos, enquanto tarefas com métricas mais intuitivas para o animal, como cavar por sinais de odores, requer menos do que 20 treinamentos para atingir o objetivo (Tong, Peace, Cleland, & Harley, 2014). Com isso, não podemos descartar uma eventual limitação do método utilizado, sendo salutar a necessidade de constante aperfeiçoamento, que por sua vez é foco de padronização em outro projeto em andamento em nosso laboratório.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Observamos que animais com lesão intranigral por rotenona apresentaram prejuízo olfatório na TDO. Os animais lesionados que passaram pelo processo de restrição crônica de sono tiveram um menor tempo de exploração do odor familiar, em comparação ao grupo controle sem lesão, evienciando um intenso prejuízo olfatório. Entretanto, não correu sinergismo entre lesão e a restrição crônica de sono.
- Os animais controle do grupo restrição crônica de sono, apresentaram um prejuízo olfatório significativo, sugerindo uma associação entre a privação de sono e o desempenho olfatório. Provavelmente a restrição promova uma supersensibilidade de receptores D2, de natureza inibitória, responsáveis pela neurotransmissão dopaminérgica nas sinapses glomerulares.
- O sono rebote restaurou a função olfatória de todos os grupos. Contudo, devido a coleta histológica não homogênea, não foi possível observar a redução na densidade de neurônios TH-ir em nenhum dos grupos tratados com rotenona, tornando qualquer discussão baseada num efeito olfatório compensatório, pelos neurônios ainda presentes, meramente especulativa.

REFERÊNCIAS

Ã, S. D., & Maclean, R. R. (2007). Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep

Braak, H., & Tredici, K. Del. (2017). Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson

Duda, J. E. (2010). Olfactory system pathology as a model of Lewy neurodegenerative disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 289(1)

Herrera-morales, W. (2017). Dopaminergic Modulation of Sleep-Wake States, 380

Lim, J. H., Davis, G. E., Wang, Z., Li, V., Wu, Y., Rue, T. C., & Storm, D. R. (2009). Zicam-Induced Damage to Mouse and Human Nasal Tissue, 4(10), 1

by Bilateral Intranigral Rotenone Administration: A New Approach for an Old Neurotoxin." *Neurotox Res* (2012) 21(3): 291-301.

Müller, A., Reichmann, H., Livermore, A., & Hummel, T. (2002). Olfactory function in idiopathic Parkinson

Reich, S. G. (2018). Parkinson Disease Parkinsonism Parkinson disease Tremor Levodopa Dyskinesias. Medical Clinics of NA. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>

Reksidler, A. B., Lima, M. M. S., Zanata, S. M., Machado, H. B., Andreatini, R., Tufik, S., & Vital, M. A. B. F. (2007). The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats, 560, 163

Sharma, M., Goyal, D., Pv, A., & Acharya, U. R. (2018). SC. Computers in Biology and Medicine. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2018.04.025>

Siegel, J. M. (2009). inactivity, 10, 747